



Laura Peltonen & Juho Tervonen

**E-KADHERIININ ILMENTYMISEN HAVAINNOINTI EUKARYOOTTISOLUISSA
FLUORESOIVAN REPORTTERIN AVULLA**

**E-KADHERIININ ILMENTYMISEN HAVAINNOINTI EUKARYOOTTISOLUISSA
FLUORESOIVAN REPORTTERIN AVULLA**

Laura Peltonen ja Juho Tervonen
Opinnäytetyö
Syksy 2012
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Laura Peltonen & Juho Tervonen

Opinnäytetyön nimi: E-kadheriinin ilmentymisen havainnointi eukaryoottisolussa fluoresoivan reportterin avulla

Työn ohjaajat: Jingdong Shan, Paula Reponen, Eeva Kurttila-Matero, Annikki Savolainen

Työn valmistuslukukausi ja -vuosi: syksy 2012

Sivumäärä 45 + 6 liitettä

Opinnäytetyömme aiheena oli havainnoida ja havainnollistaa eukaryoottisolujen muuntumista mesenkymaalisen solulinjan solusta epiteelisoluksi. Havainnoimme epiteelisolulle tyypillisen pinta-proteiinin, E-kadheriinin, ilmentymistä eri kehitysvaiheissa olevien solulinjojen immunovärjäyksillä. Lisäksi tutkimme, voiko solujen muuntumisprosessia solutyypistä toiseksi havaita viemällä soluun sisälle E-kadheriinin promoottorilla toimiva reportterigeeni. Tutkimme myös, miten eri indusoivat aineet vaikuttivat E-kadheriinin ekspressioon solukalvon pinnalla.

Tutkimuksen taustalla oli tarve kehittää menetelmä, jolla voitaisiin seuloa potentiaalisia munuaisen kehitykseen vaikuttavia transkriptiotekijöitä. Nykyisin käytössä oleviin menetelmiin kuuluu mahdollisten transkriptiotekijöiden tutkiminen hiirimalleilla, joka tutkimuksena kestää pitkään ja on kallista. Solumalli, joka pystyisi reportterigeenin avulla kertomaan solutyypin muuttumisesta mesenkymaalisesta epiteeliksi, nopeuttaisi huomattavasti olemassa olevaa tutkimusta.

Kokeilemistamme vektoreista yksi osoittautui hieman muita toimivammaksi E-kadheriiniekspression ilmentäjäksi. Lisäksi havaitsimme, että käyttämämme MK3- ja MK4-solulinjat eivät ilmentäneet E-kadheriinia odotetusti ja että ekspressio lisääntyy induktorien vaikutuksesta. Saamiemme tulosten pohjalta tutkimusryhmä saattoi edetä suunnittelemaan vektoreilla tehtävää pysyvää transfektiotekniikkaa, minkä tarkoituksena on pystyä lopulta tekemään seulontatestejä transkriptiofaktoreille.

Asiasanat: transfektio, kadheriinit, immunofluoresenssitekniikka, organogeneesi

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Laura Peltonen and Juho Tervonen

Title of thesis: Visualization of E-Cadherin Expression via Fluorescent Reporter Gene in Eukaryotic Cells

Supervisors: Jingdong Shan, Paula Reponen, Eeva Kurttila-Matero, Annikki Savolainen

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2012

Number of pages: 45 + 6 appendices

The basis for our study was the demand to construct more efficient techniques for identifying the potential transcription factors that participate in the renal development. Currently used methods include mouse models which tend to be expensive, time consuming and ethically problematic. Thus a cell model that could visualize the transition of mesenchymal to epithelial could speed up the research on renal development.

The aim of our thesis was to observe and visualize the mesenchymal-epithelial transition in eukaryotic cell lines. We observed the expression of epithelial specific protein E-cadherin by immunostaining of cell lines in different stages of development. In addition we examined whether a fluorescent reporter could be used to visualize the transition process. We also examined how the E-cadherin expression would be affected by cell inducing substances.

One vector tested seemed to have slightly more potential to be used for the visualization of E-cadherin expression and therefore also for the visualization of mesenchymal-epithelial transition. Furthermore, we found out that the MK3 and MK4 cell lines did not express E-cadherin as expected and yet inducing substances increase the level of E-cadherin expression. Results encouraged the research group to go on with this approach and to perform stable transfections for cell lines in order to develop a cell line for various transcription factor screening tests.

Keywords: *Transfection, Cadherins, Fluorescent Antibody Technique, Organogenesis*

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELUPROSESSI JA TAVOITTEET	8
3	TYÖN GENEETTINEN TAUSTA	11
3.1	Geenien säätely	11
3.2	Wnt-signaaliointi	12
3.3	Yellow fluorescent protein, YFP	13
3.4	Käyttämämme plasmidi	14
4	SOLUT	16
4.1	Solujen muutos mesenkymaalaisesta epiteeliksi	16
4.2	E-kadheriini	16
4.3	Työssä käyttämämme solulinjat	17
5	KÄYTTÄMÄMME MENETELMÄT	19
5.1	Bakteerien kasvatus ja plasmidin eristys	19
5.2	Solujen steriiliviljely	20
5.3	Lipofektio	21
5.4	Solujen indusointi	22
5.5	Immunohistokemia	23
5.6	Mikroskopointi	25
6	TYÖN TOTEUTUS	27
6.1	Plasmidi-DNA:n monistus ja eristys	28
6.2	Transfektio	30
6.3	Immunohistokemia	31
6.4	Mikroskopointi	31
7	TULOKSET	33
7.1	Solujen E-kadheriiniekspressio	33
7.2	Transfektoidut solut	34
7.3	Indusoitujen solujen E-kadheriiniekspressio	35
7.4	Tulosten arviointi	37
8	POHDINTA	40
	LÄHTEET	42
	LIITTEET	45

1 JOHDANTO

Molekyylibiologian sekä solu- ja kehitysbiologian aihealueita sisältävä opinnäytetyömme oli osa professori Seppo Vainion johtamaa tutkimusta. Työ tehtiin Oulun yliopiston Biocenter Oulun kehitysbiologian laboratoriossa. Opinnäytetyömme aiheena oli testata E-kadheriinin ekspressiota nefronin kehitysvaihetta mallintavista solulinjoista sekä näitä solulinjoja käyttäen valita sopiva reporterikonstruktio ilmentämään solutyypin muuttumista toiseksi. Lisäksi työllemme olennaista oli testata solulinjojen toimivuus erilaistumisen havainnollistamiseen. Tämä tehtiin vertaamalla aikaisemman kehitysvaiheen solujen E-kadheriiniekspressiota saman solulinjan soluihin, joita oli käsitelty solujen erilaistumiseen vaikuttavilla aineilla.

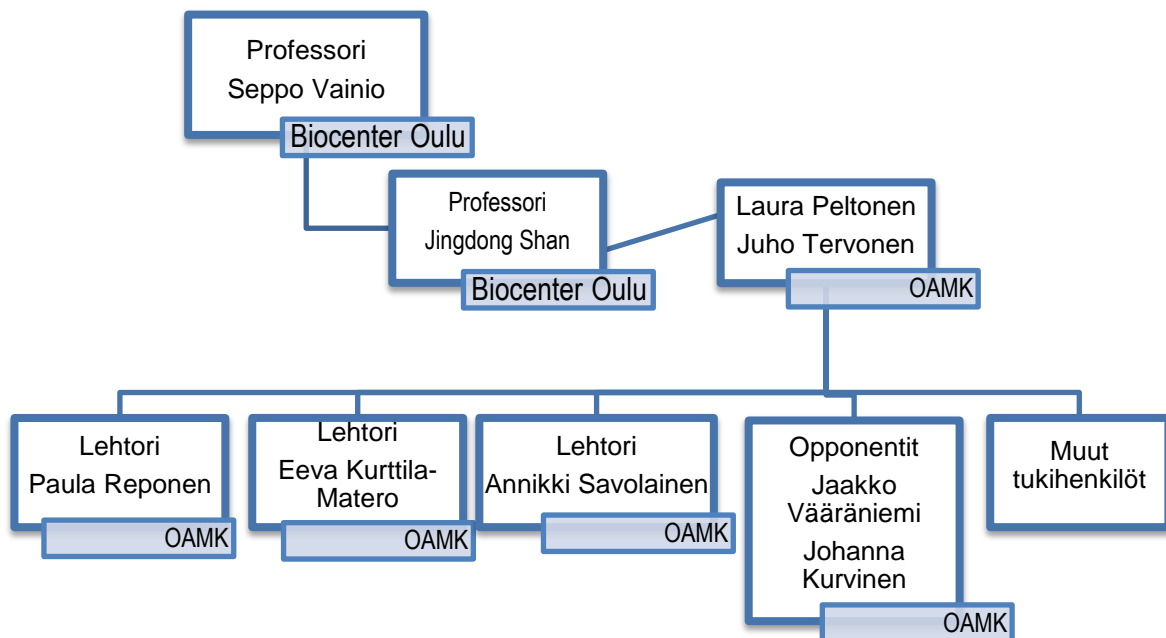
Opinnäytetyön taustalla oli Vainion tutkimusryhmässä ilmennyt tarve kehittää tehokas ja nopea transkriptiotekijöiden seulomiseen käytettävä menetelmä. Nykyisin käytössä oleviin menetelmiin kuuluu mahdollisten transkriptiotekijöiden tutkiminen hiirimalleilla, joiden kehittäminen kestää pitkään ja on kallista. Laissa eläinten käytöstä eläinkokeisiin mainitaan myös, että eläinkoe on korvattava muulla menetelmällä, mikäli vastaava tulos on saavutettavissa edes osittain muilla menetelmillä (laki koe-eläintoiminnasta 62/2006 3:7 §). Solumalli, joka pystyisi reporterigeenin avulla kertomaan solutyypin muuttumisesta mesenkymaalisesta solutyypistä epiteeliksi, voisi nopeuttaa olemassa olevaa tutkimusta ja vähentää tutkimuksessa tarvittavien koe-eläinten käyttöä. Vainion tutkimusryhmä tutkii munuaisaihion kehittymistä alkion kehittymisen aikana sekä munuaisen kehittymiseen vaikuttavia kasvutekijöitä. Vainion tutkimusryhmän tavoitteena on pystyä kehittämään kantasoluterapiakeinoja munuaissairauksiin.

Yksilön kehitymisprosessin aikana munuaisen nefronit kehittyvät mesenkymaalisesta kantasolupopulaatiosta. Nisäkkäillä solujen erilaistuessa munuaisen nefronin kantasolut kuluvat loppuun ennen syntymää. Solujen uudelleenohjelmointi munuaisen kantasoluiksi olisi hyvä vaihtoehto saada aikaan solukko, joka kykenee *de novo* nefrogeneesiin eli nefronin solukon luomiseen uudelleen alusta asti. (Hendry, Caroline, Little, Melissa 2011, 13) Vainion tutkimusryhmä on onnistunut tunnistamaan joukon transkriptiofaktoreita, jotka mahdollisesti vaikuttavat munuaisen nefronin kehittymiseen. Jos nefronin kehittymiselle kriittiset transkriptiofaktorit pystyttäisiin tunnistamaan, voisi tulevaisuudessa olla mahdollista kehittää lääke, joka saa munuaisen omat solut muuttumaan kantasolun kaltaisiksi ja siten uudistamaan munuaisen kudoksen.

Opinnäytetyöprojektissämme tutkimme epiteelisolujen pinnalla esiintyvän proteiinin, E-kadheriinin, ilmenemistä eri solulinjojen soluilla. Tarkoituksenamme oli arvioida, miten hyvin E-kadheriiniekspressio korreloi solulinjatyyppin kanssa. Lisäksi transfektoimme eukaryoottisoluihin reportterigeenejä, joilla oli E-kadheriinin promoottorialue. Tämän avulla pyrimme selvittämään, olisiko mahdollista seurata E-kadheriinin ekspressiota soluissa reportterigeenin tuottaman signaalin avulla.

2 OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELUPROSESSI JA TAVOITTEET

Projektimme organisaatioon kuuluivat asettaja, projektipäälliköt, ohjausryhmä, asiantuntijat sekä erillisenä ryhmänä muut tukijat. Projektimme asettajia olivat professori Seppo Vainio (Biocenter Oulu) sekä hänen tutkimusryhmässään toimiva professori Jingdong Shan, joka toimi myös alan asiantuntijana sekä työmme ohjaajana. Ohjausryhmään kuuluivat lehtori Paula Reponen, lehtori Eeva Kurttila-Matero, lehtori Annikki Savolainen sekä opponenteina bioanalytiikan opiskelijat Jaakko Vääräniemi ja Johanna Kurvinen. Muita tukihenkilöitä olivat mm. suomen kielen opettaja, englannin kielen opettaja, Biocenter Oulun henkilökunta sekä opiskelijakollegat. Organisaatio on esitettyä kaaviomuodossa kuviossa 1.



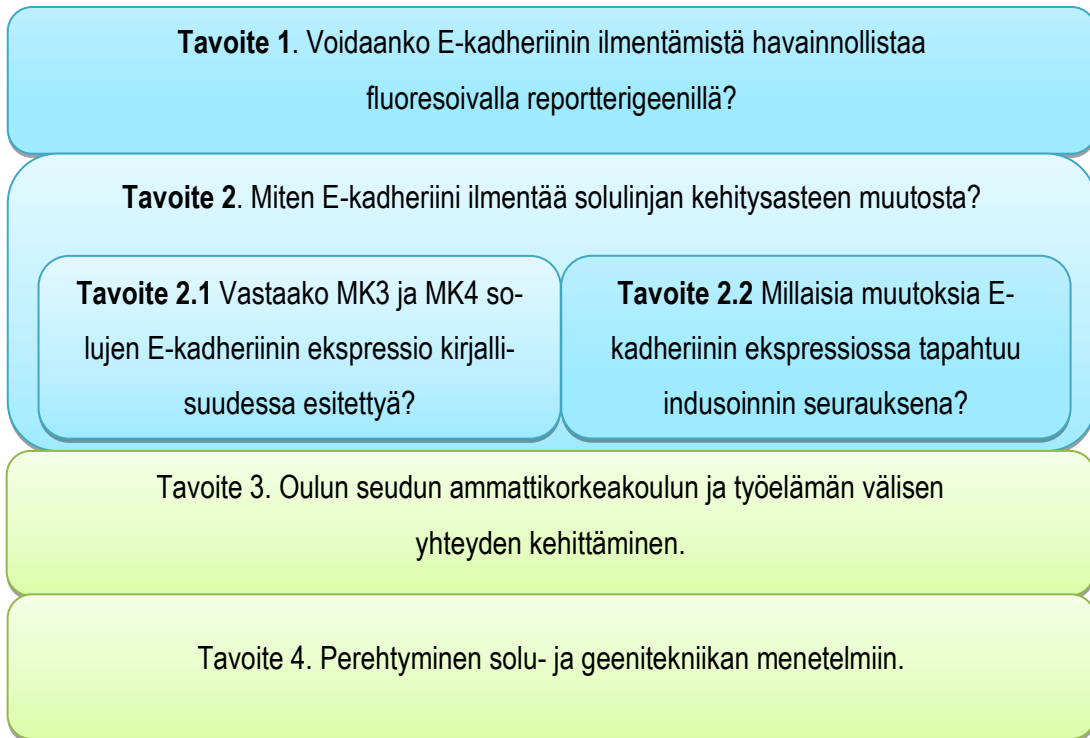
KUVIO 1. Organisaatiokaavio

Työmme päätavoitteena (tavoite 1) oli selvittää, voidaanko E-kadheriinin ilmenemistä havainnollistaa fluoresoivalla reportterigeenikonstruktilla ja tällä tavoin havainnollistaa mesenkymaalisen solun muuttumista epiteelisoluksi *in vitro*. Asian selvittämiseksi kokeilimme useita erilaisia reportterikonstrukteja eri solulinjoissa. Opinnäytetyöstä seuraavien johtopäätöksien perusteella tilaajan on mahdollista valita kaikista testatuista vaihtoehdoista se konstrukti, joka ilmentää parhaiten solun muuntumista solutyypistä toiseksi. Lisäksi tilaajan on tulevaisuudessa mahdollista valmistaa pysyvä solulinja, jota voi käyttää transkriptiotekijöiden seulontatutkimuksissa. Opinnäytetyömme tavoitteet ovat esitettynä kuviossa 2.

Aiheen toteuttamiseksi oli selvitettävä, miten hyvin E-kadheriinin ilmeneminen solukalvolla kuvastaa käytetyn solulinjan kehitysasteen muutosta (tavoite 2). Tutkimme, tukeeko MK3- ja MK4-solulinjojen E-kadheriiniexpressio kirjallisuudessa esitettyä väitettä siitä, että em. solulinjat vastaisivat munuaisen mesenkymaalisolukkoa ja varhaista epiteelisolukkoa (tavoite 2.1). Näiden lisäksi tavoitteenamme oli selvittää, millaisia muutoksia E-kadheriinin ilmenemisessä tapahtuu, kun solut indusoidaan eri induktoreilla (tavoite 2.2). Indusoinnilla halusimme tutkia, voitaisiinko E-kadheriinin ilmenemisellä todella havainnollistaa solutyypin muutosta MK3-solujen kypsyessä kohti epiteelinomaisempaa muotoa. Tulokset luovat pohjaa jatkotutkimuksia varten, missä tutkimusryhmän on tarkoitus käyttää solulinjoja eri transkriptiofaktoreiden seulomiseksi.

Oulun seudun ammattikorkeakoulun tavoitteissa tutkintoon johtavista opinnoista mainitaan työelämälähtöinen koulutus toteutettuna yhdessä työ- ja elinkeinoelämän kanssa. Näiden opintojen tavoitteena on antaa opiskelijalle laaja-alaiset valmiudet asiantuntijatehtäviin, edellytykset alan kehityksen seuraamiseen ja edistämiseen sekä elinikäiseen oppimiseen. (Oulun seudun ammattikorkeakoulu 2011, hakupäivä 25.9.2012). Ammattikorkeakoulun vastaavuudesta työelämän edellytyksiin mainitaan myös Opetus- ja kulttuuriministeriön kehittämissuunnitelmassa ammattikorkeakouluille vuosille 2011–2014 (Opetus- ja kulttuuriministeriö, hakupäivä 25.9.2012). Tavoitteenamme oli osaltamme edistää Oulun seudun ammattikorkeakoulun ja työelämän yhteyttä toteuttamalla opinnäytetyö työelämän tilaajien kanssa yhteistyössä (tavoite 3).

Henkilökohtaisiksi oppimistavoitteiksi asetimme perehtymisen eri solu- ja geeniteknikan tutkimusmenetelmiin. Olemme molemmat toteuttaneet syventävät opintomme molekyylibiologian ja genetiikan opintojaksoilla sekä suunnanneet syventävät harjoittelumme näihin koulutuksen osaluaisiin. Toivoimme opinnäytetyön syventävän edelleen tietojamme ja taitojamme sekä lisäävän asiantuntemustamme aiheesta kokonaisuudessaan (tavoite 4).



KUVIO 2. Opinnäytetyön tavoitteet

3 TYÖN GENEETTINEN TAUSTA

Selviytyäkseen solujen täytyy reagoida ympäristön muutoksiin. Yksi tapa, jolla solut reagoivat ympäristönsä muutoksiin, on muuttaa tiettyjen geenien ilmenemistä. Muutos geenin luennassa vaikuttaa geeniä vastaavien proteiinien määrään solussa. Monisoluisilla organismeilla on erityisiä geenejä, jotka ohjaavat solujen erilaistumista eri kudoksiksi. Joitakin näistä geeneistä (ns. house-keeping-geenit) ilmennetään lähes kaikissa soluissa, kun taas toiset geenit aktivoidaan vain tarvittaessa. Eräät geenit voivat olla kokonaan hiljennettyinä muissa kuin tietyssä solutyypissä. (Weeks & Donelson 2006. 292, 305)

3.1 Geenien säätely

Transkription aloitus RNA-polymeraasilla lienee tärkein tapahtuma geenien ilmenemisen säätelyssä. Transkription aloittamiseen tarvitaan erikoistuneita DNA-sekvenssejä, joita kutsutaan promoottoreiksi. Nämä promoottorialueet kertovat, mistä RNA-synteesin tulisi alkaa. Promoottorialueiden tunnistamiseen liittyy proteiinifaktoreita, jotka pystyvät sitoutumaan sekä DNA:han että polymeraasientsyymiin ja näin säätelemään transkription aloitusta. (Schmidt & Setzer 2006, 175)

Transkriptio alkaa promoottorialueen sekvenssin tunnistamisella. Tyypillisesti promoottorialueet sijaitsevat DNA-juosteessa hieman ylävirtaan transkription aloittavasta nukleotidista. Jotkin DNA-sekvenssit stimuloivat transkriptiota kauempaa ja ovat sijainniltaan riippumattomia transkription aloituskohdasta. Näitä säätelyalueita kutsutaan tehostaja-alueiksi (*engl. enhancer*). Tehostaja-alueet stimuloivat synteesiä sitomalla spesifisiä proteiineja, joita kutsutaan aktivaattoreiksi. Kun aktivaattori sitoutuu tehostaja-alueeseen, DNA:n rakenne muuttuu (usein syntyy silmukka tai DNA-säie taipuu). Rakennemuutos mahdollistaa aktivaattorin vuorovaikutuksen muiden faktoreiden sekä RNA-polymeraasin kanssa. Nämä interaktiot helpottavat transkription aloitusta. (Schmidt & Setzer 2006, 176–177)

Bakteerien RNA-polymeraasista poiketen eukaryoottinen RNA-polymeraasi ei sitoudu sekvenssispesifisesti promoottorialueelle. Eukaryoottisolussa muodostetaan transkriptiofaktoreista aloituskompleksi (*engl. initiation complex*) ns. TATA-sekvenssilaatikon kohdalle. Se sijaitsee noin 27 emäsparin päässä ennen transkription aloituskohtaa. Polymeraasientsyymi sitoutuu TATA-sekvenssilaatikkoon aloituskompleksin ohjaamana ja aloittaa toimintansa. Muita tunnettuja ns.

konsensus-sekvenssejä, jotka edesauttavat transkription aloitusta, ovat mm. CAAT-laatikko ja GC-laatikko. (Weeks & Donelson 2006, 307–309).

Geenien ilmentämistä eukaryoottisoluisissa voidaan tutkia *in situ* hybridisaatiolla, jossa kudosleikkeissä olevia nukleiinihappoja voidaan paikallistaa niille komplementaaristen signaalimolekyyleillä merkattujen nukleiinihappujuosteiden kanssa (NCBI:n Probe-tietokanta 2012, hakupäivä 3.10.2012). Tarkemmin ja herkemmin geenien ekspressiota voidaan kuitenkin havainnollistaa reportteriproteiinin geenin sisältävillä ekspressiovektoreilla. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi liittämällä halutun geenin promoottorialue suoraan reportteriproteiinin geeniin. Näin solun ekspresoidessa tutkittavaa geeniä ekspressoituu samanaikaisesti myös reportterigeeni. Tällaista konstruktia kutsutaan promoottorifuusioksi (*engl. promoter-fusion*). Yleisesti käytettyjä reportteriproteiineja ovat erilaiset fluoresoivat proteiinit, joita on helppo havainnoida. (Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher & Ploegh 2008, 197–198) Opinnäytetyömme ekspressiovektori oli rakennettu promoottorifuusiotekniikalla.

3.2 Wnt-signaointi

Wnt-signaalireitillä on merkittävä tehtävä yksilönkehityksessä. Wnt-säätelymolekyylit mm. osallistuvat gastrulaatioon, neurulaatioon ja keskiaivojen organogeneesiin, keskushermoston kehitykseen, munuaisen, raajojen ja genitaalien kehittymiseen. Wnt-molekyylit toimivat usein kasvu- ja differentiaatiofaktoreina kehityksen aikana. Wnt-geenien perheeseen kuuluu 19 jäsentä, joista useimmat koostuvat 350–400 aminohaposta. (Heikkilä 2002, 40)

Shanin, Jokelan, Skovorodkinin ja Vainion (2009, 57) mukaan Wnt-4-geeni koodaa signaalimolekyylä, joka ohjaa useiden elinten kehittymistä. Geeni ohjaa mm. munuaisen, lisämunuaisen, munasarjan, maitorauhasten ja aivolisäkkeen kehittymistä. Geenin ajatellaan myös toimivan alkion munuaisaihiossa nefrogeneesin alullepanijana. Wnt-4-geeni kuuluu Wnt-geenien superperheeseen, jotka koodittavat kasvu- ja erilaistumistekijöitä. Geeni on välttämätön munuaisen kehittymiselle.

Tutkimusryhmä, mihin teimme opinnäytetyömme, keskittyy Wnt-4-signaointireitin tutkimukseen. Ryhmä on tunnistanut joukon signaointireittiin liittyviä transkriptiofaktoreita, ja tutkijat pyrkivät nyt identifioimaan ne transkriptiofaktorit, joita tarvitaan munuaiskeräsen kehittymiseksi.

3.3 Yellow fluorescent protein, YFP

Osamu Shimomura ja Frank Johnson eristivät ensimmäisenä kalsium-riippuvaisen aequorin bioluminesenssi-proteiinin *Aequorea victoria*-meduusasta vuonna 1961. Samalla he eristivät toisen proteiinin, joka kykeni tuottamaan vihreän fluoresenssin ultraviolettivalon vaikutuksesta. Tämän ominaisuutensa vuoksi proteiinia alettiin kutsua vihreäksi fluoresoivaksi proteiiniksi (*engl. Green Fluorescent Protein, GFP*). GFP-geeni kloonattiin ensimmäisen kerran vuonna 1992. Tämän jälkeen GFP-proteiini on levinnyt tutkimuskäyttöön ja sitä on muokattu tuottamaan värikkäitä mutanttilajeja, fuusioproteiineja ja biosensoreita. Näitä kaikkia voidaan kutsua GFP-proteiineiksi. (Piston D., Patterson G., Claxton N. 2012. Hakupäivä 3.10.2012).

Luontainen GFP-proteiini on 27 kDa:n kokoinen peptidi, ja sen koko rakenne on tarpeellinen fluoresenssin syntymiselle. Aminohappotripletti seriini, tyrosiini ja glysiini (ser56, tyr66, ja gly67) ovat fluoresenssin syntymiselle erittäin tärkeitä, sillä ne muodostavat fluoroforin keskelle hyvin stabiilin tynnyrimäisen rakenteen. Fluoroforilla on kaksi eksitaatiomaksimia 395 nm:n ja 475 nm:n aallonpituuksilla. Emissiomaksimi on aallonpituudella 507 nm:ä. (Piston D. ym. 2012. Hakupäivä 3.10.2012).

Keltainen fluoresoiva proteiini syntyi, kun lähellä kromoforia sijaitseva threoniini vaihdettiin tyrosiiniin. Tämä mutaatio sai aikaan 20 nanometrin siirtymän eksitaatio- ja emissiospektreissä. Jatkokehittelyn tuloksena syntyi tehostettu keltainen fluoresoiva proteiini EYFP (*engl. Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), mikä on yksi kirkkaimmista ja eniten käytetyistä fluoresoivista proteiineista. (Piston D. ym. 2012, hakupäivä 3.10.2012).

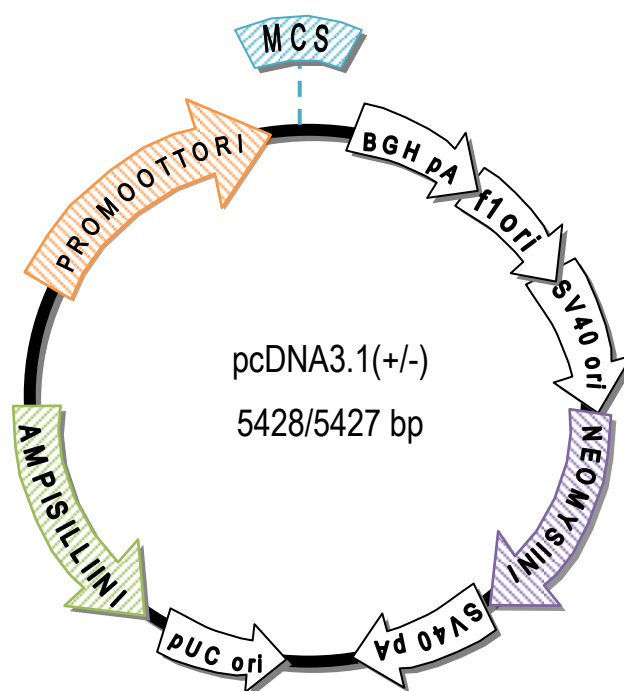
Fluoresoivat proteiinit ovat hyvin monikäyttöisiä, ja niitä käytetään erilaisissa tutkimuksissa aina mikrobiologiasta elimistön fysiologiaan. Nämä helposti saatavilla olevat ilmaisimet ovat olleet hyödyllisiä geeniekspression reporttereita soluviljelmissä, kudoksissa ja jopa eläimissä. Fluoresoivia proteiineja käytetään elävissä soluissa ilmentämään proteiinien sijaintia ja dynamiikkaa sekä havainnollistamaan soluorganelleja tai solun osia. Käytetyin menetelmä saada fluoresoivan proteiinin geenisekvenssi soluun on käyttää muokattuja bakteerien plasmideja ja viraalisia vektoreita. (Piston D. ym. 2012. Hakupäivä 3.10.2012).

Työssämme havaitsimme solujen tuottaman YFP:n fluoresenssimikroskoopilla. Fluoresenssimikroskopiassa näytteestä voidaan havainnollistaa tiettyjä kohteita, kuten esimerkiksi proteiineja tai

antigeenejä, niiden sisältämien fluoresoivien proteiinien tai niihin käsittelemällä liitettyjen fluorokromien eli fluoroforien avulla. Fluorokromit ovat kemiallisia yhdisteitä, jotka absorboivat valoa tietyltä aallonpituudelta itseensä. Tämä saa aikaan molekyylin elektronien viritystilän, joka purkautuu näkyvän valon emissiolla. Fluorokromit voidaan virittää joko ultraviolettivalolla (UV) tai näkyvällä valolla, kuten konfokaalimikroskopiassa käytettävällä laserilla. (Solunetti 2006a, hakupäivä 1.10.2012; Herman, B., Centonze Frohlich, V., Lakowicz, J., Murphy, D., Spring, K., Davidson, M. 2012, hakupäivä 1.10.2012)

3.4 Käyttämämme plasmidi

Plasmidimme oli rakennettu Invitrogenin pcDNA3.1 -plasmidin pohjalta (Invitrogen 2010, hakupäivä 3.10.2012). Plasmidin rakenne on esitettyä pelkistetysti alla olevassa kuviossa 3. Plasmidin eri elementeillä, kuten esimerkiksi promoottori- ja monikopiointialuella (*engl. Multiple Cloning Site, MCS*), on omat tehtävänsä vektorin toiminnassa. Näistä työmme kannalta merkityksellisimmät ovat merkitty kuviossa korostetulla värityksellä.



KUVIO 3. Plasmidi, jonka mukaan vektorit oli valmistettu Invitrogeniä (2010, hakupäivä 3.10.2012) mukailten

Plasmidin tärkeimpiä elementtejä monistamisen kannalta olivat seulomiseen tarkoitettut antibioot-tiresistenssi-geenit. Käytimme transformoitujen bakteerien seulontaan ampisilliiniresistenssiä, sillä neomysiiniresistenssi on valmistajan mukaan suunnattu pysyvän transfektion seulontaan. Tämä ominaisuus kuitenkin teki mahdolliseksi sen, että eristämiämme plasmideja voisi käyttää sellaisenaan pysyvän transfektion tekemiseen, eikä uutta plasmidia tarvitsisi valmistaa.

Työllemme olennaisimmat osat olivat promoottori- sekä MCS-alue. Työssä testatut vektorit erosivat toisistaan erilaisten promoottorialueiden perusteella. Heti promoottorialueen jälkeen tulevaan MCS-alueeseen oli liitetty aktivoituessaan fluoresoivaa proteiinia tuottava geeni.

4 SOLUT

Hendryn ym. (2011, 10) mukaan munuaisiin kohdistuvien tautien hoitaminen vaatii useiden toiminnaltaan erilaisten nefronin solujen korvaamista tai uudistamista. Useat eri asiat kuitenkin rajoittavat sellaisen lähestymistavan käyttöä, jossa tietty solutyyppi ohjelmoitaisiin uudelleen. Hendry ym. mainitsevat myös, ettei olisi järkevää ohjelmoida useita erillisiä solupopulaatioita ja siirtää niitä kohdesolukkoon. Heidän mukaansa nefronin kantasolun luominen kiertäisi ihanteellisimmiin näitä ongelmia, sillä siitä voi syntyä kaikkia nefronin solutyyppiä. Opinnäytetyömme tilaajan, Seppo Vainion tutkimusryhmän, päätavoitteena on kehittää näihin munuaisiin kohdistuvien tautien hoitoja kartoittamalla transkriptiogeneenejä, jotka osallistuvat nefronien kehitykseen kantasolusta. Tätä kautta nefronin kantasolun kehittäminen hoitoja varten voisi olla tulevaisuudessa mahdollista.

4.1 Solujen muutos mesenkymaalaisesta epiteeliksi

Munuaisen kehitysvaiheessa tapahtuu ilmiö, missä mesenkymaaliset solut muuttuvat epiteelisoluuksi. Starkin ja Vainion tutkimuksen mukaan Wnt-4-geeni indusoi tätä mesenkymaalisten solujen muutosta epiteelisolukoksi, mikä myöhemmin johtaa nefronin tubuluksien muodostumiseen (1994, 679). Tästä mesenkymaalisen solutyyppin muutoksesta epiteelisolukoksi käytetään lyhennettä MET (*engl. Mesenchymal to Epithelial Transition*). Opinnäytetyössämme havainnoitiin tätä ilmiötä mm. tarkkailemalla MK3- ja MK4-solujen E-kadheriini-ekspressiota sekä seuraamalla E-kadheriinin ilmentymisessä esiintyvää muutosta, kun soluja indusoitiin eri yhdisteillä.

4.2 E-kadheriini

Epiteelikudos määritetään sen ainutlaatuisen rakenteensa avulla, missä yksittäiset solut muodostavat tiukkoja sidoksia toistensa välille lukuisten eri soluorganellien välityksellä. Tämän seurauksena epiteelisolut pysyttelevät paremmin paikoillaan kuin muut, mesenkymaalista syntyperää olevat solut. Epiteelisolut muodostavat selektiivisiä puoliläpäiseviä vyöhykkeitä ja toimivat aineiden kuljetusprosesseissa kudoksiin. Useita näitä epiteelisoluille tyypillisiä ominaisuuksia säätelee solujen välinen adheesiomolekyyli E-kadheriini. Se on 120 kDa:n kokoinen transmembraaniproteiini, jota ekspressoitetaan erityisesti epiteelisoluuissa, ja se on olennainen osa solujen epiteelistä fenotyyppiä. (Behrens, J., Lowrick, O., Klein-Hitpass, L. & Birchmeier, W. 1991, 11495)

Kadheriinia koodaavan geenin säätelyalue koostuu promoottorialueesta (nukleotidista -94 transkription alkukohtaan asti) ja 150- aminohapon tehostaja-alueesta, joka sijaitsee ensimmäisen intronijakson sisällä. 5'-päässä sijaitseva promoottorialue koostuu positiivisista säätelyelementeistä (CCAAT-laatikosta sekä kahdesta AP-2-transkriptiofaktorin sitoutumiskohdasta GC-rikkaalla alueella), sekä palindromisesta E-Pal-elementistä, joka aktivoi transkriptiota epiteelisoluissa mutta repressoi mesenkymaalisissa soluissa. E-kadheriinin ilmenemistä määrittää kaksi mekanismia: mesenkymaalisessa solukossa E-Pal hiljentää promoottorin ja epiteelisoluissa sekä E-Pal että epiteelispesifinen tehostaja-alue aktivoivat ekspressiota. (Hennig, G., Lowrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. 1996, 595)

4.3 Työssä käyttämämme solulinjat

Tutkittaessa solujen toimintaa molekyylitasolla ei välttämättä voida tutkia kokonaista elintä tai kudosta kerrallaan, sillä elimet ja kudokset sisältävät useita erilaisia solutyyppejä. Tällöin on hyvä tutkia ilmiöitä soluviljelmissä, joissa kasvatetaan homogeenisesti yhtä solutyyppiä. (Lodish ym. 2008, 394) Työssämme käytimme neljän erilaisen solutyypin solulinjoja.

CHO-solut

CHO-solulinja (*engl. Chinese Hamster Ovary cells*) on peräisin kiinanhamsterin munasarjoista. Niitä käytetään usein biologisessa ja lääketieteellisessä tutkimuksessa ja kaupallisten terapeuttisten proteiinien tuotannossa. Solulinjan soluja kasvatettiin itsenäisenä soluviljelmänä ensimmäisen kerran vuonna 1957, ja ne kasvavat yksinkertaisena solukerroksena. Kasvaakseen ne vaativat mm. proliinia kasvatusmediumissa. CHO-soluja käytetään yleisesti geenitutkimuksissa, myrkyjen seulontatutkimuksissa ja ravinto- ja geeniekspression tutkimisessa. Nykyään CHO-solut ovat useimmin käytetty nisäkässolutyyppi terapeuttisten rekombinanttiproteiinien teollisessa tuotannossa. (Jaypal, K., Wlaschin, K., Hu, W-S. 2007, 40–47)

Työssä käyttämämme CHO-solut toimivat kontrollina lipofektiomenetelmällä tehdyille transfektiolle. CHO-solut tuottavat luontaisesti E-kadheriinia, jolloin transfektion onnistuessa CHO-soluissa pitäisi aktivoitua myös fluoresoiva markkeri. Myös eri reportterikonstruktioiden toimivuutta voitiin arvioida CHO-soluista.

MK3- ja MK4-solut

Valeriuksen, Pattersonin, Witten ja Potterin mukaan työssä käyttämämme MK3-solut edustavat aikaista metanefristä mesenkyymiä, joka ei vielä ole alkanut muuttumaan epiteeliksi. Muodoltaan nämä solut näyttävät fibroblastisilta, eivät epiteeleiltä. MK3-solut ekspressoivat indusoimattomalle mesenkyymille tyypillisiä geenejä, kuten kollageeni I:stä ja vimentiniä. Valeriuksen ym. mukaan MK3-solut eivät ekspressoisi niitä geenejä, joita esiintyy indusoidussa mesenkyymissä. (2002, 159).

Työssä käytetyt MK4-solut edustavat Valeriuksen ym. (2002, 160) mukaan kehitykseltään myöhempää, induoitua metanefristä mesenkyymiä, joka on aloittanut muuttumisen epiteelisolukoksi. Muodoltaan MK4-solut ovat enemmän kulmikkaita ja epiteelimäisiä kuin MK3-solut. Lisäksi MK4-solut ekspressoivat geenejä jotka liitetään indusoidun mesenkyymien toimintaan. Valeriuksen ym. mukaan MK3- ja MK4-solut tarjoavat pysäytyskuvan indusoimattomasta ja indusoidusta metanefristä mesenkyymisolukosta munuaisen kehittyessä.

Tutkimme työssä käyttämiemme MK3-solujen E-kadheriinin ekspressiota sekä ennen solulinjojen indusointia että indusoinnin jälkeen. Tarkoituksena oli saada selville, onko E-kadheriinin ilmeneminen riittävän tarkka merkki proteiini solumuutoksen tarkkailuun.

W4MC-solulinja

W4MC-solulinja on MK3-soluista lähtöisin oleva solulinja, johon on transfektoitu mCherry-reportterigeeni. Reportterigeenin promoottorialue on peräisin Wnt-4-signalointireitistä. W4MC-solulinjan on kehittänyt työmme ohjaaja prof. Jingdong Shan. Ilmentäessään Wnt-4-signalointireitin proteiineja solu ilmentää myös mCherry-fluoresenssiproteiinia. Käytimme W4MC-soluja opinnäytetyössämme ohjaajamme pyynnöstä, sillä oli mielenkiintoista nähdä onko W4MC-solujen E-kadheriiniekspressiolla eroa transfektoimattomien MK3-solujen E-kadheriiniekspressioon. (Shan 19.9.2012, haastattelu)

5 KÄYTTÄMÄMME MENETELMÄT

Työssä käytettyjä menetelmiä olivat plasmidi-DNA:n eristäminen ja puhdistus, eukaryoottisolujen kasvatus soluviljelmässä, vektorin transfektio eukaryoottisoluihin lipofektiomenetelmällä, immuunivärjäys sekä mikroskopointi konfokaalimikroskoopilla. Kaikki työvaiheet toteutettiin kolmen viikon ajanjaksossa. Ajallisesti sitovin työvaihe oli käytettyjen solulinjojen steriilikasvatus, missä saimmekin apua opinnäytetyön ohjaajaltamme. Saimme myös kattavan perehdytyksen konfokaalimikroskoopin käyttöön ennen valmistamiemme näytteiden mikroskopointia. Toteutimme osan työvaiheista yhtäaikaisesti ajan säästämiseksi huolimatta siitä, että tulosten saaminen työvaiheittain olisi voinut tuoda lisätietoa myöhempisiin työvaiheisiin ja näin parantaa lopputulosta.

5.1 Bakterien kasvatus ja plasmidin eristys

Geeniteknologisissa tutkimuksissa tarvitaan usein suuria määriä haluttua geeniä. Geenin DNA:n kopioimiseksi on useita keinoja, kuten monistaminen PCR:llä tai bakteereihin siirrettävän vektorin avulla. Bakteereilla on luonnostaan kromosomaalisen perimän lisäksi perimää, joka sijaitsee kaksijuosteisissa DNA-renkaissa eli plasmideissa. Bakteerien jakautuessa kopioituu tytärsoluihin sekä kromosomaalinen perimä että plasmidit. (Lodish ym. 2008, 176–178) Plasmidia, johon on siirretty kopioitava DNA-juoste, kutsutaan vektoriksi. Bakteereihin viedyn vektorin avulla voidaan monistaa suuriakin määriä näytettä. Bakteerien jakautumisen jälkeen plasmidit voidaan eristää soluista. (Solunetti 2006b, hakupäivä 3.10.2012).

Jotta vektoreita voidaan monistaa, tulee sillä olla tiettyjä ominaisuuksia. Tärkeimpiä ovat monistumisen aloituskohta ORI (*engl. Origin of Replication*), transformoitujen eli vektorin sisäänsä ottaneiden bakteerien seulomiseen tarvittava selektioalue sekä alue, johon haluttu DNA-juoste voidaan siirtää. Seulomiseen voidaan käyttää vektoriin lisättyä antibioottiresistenssi-geeniä. Kasvattaessa transformoituja bakteereita antibioottia sisältävässä mediumissa selviävät vain ne tytärsolut, jotka ovat saaneet plasmidin avulla kyvyn vastustaa valittua antibioottia. (Lodish ym. 2008, 178)

Jotta monistettu DNA saataisiin käyttöön, täytyy se erottaa bakteerin genomisesta DNA:sta ja muusta ylimääräisestä materiaalista, kuten proteiineista ja solukalvon fosfolipideistä. Plasmidien eristämiseen on olemassa useita menetelmiä, joista nopeimpia ja helpompia ovat kaupalliset

plasmidineristyspakkaukset. Sekä perinteisissä että uudempiin menetelmiin perustuvissa eristysmenetelmissä solujen hajotus tapahtuu samalla mekanismilla, SDS/NaOH-lyysauksella. Menetelmän kehittivät Birnboim ja Doly jo vuonna 1979 (Macherey-Nagel 2012, hakupäivä 17.6.2012). Menetelmässä SDS eli natriumdodekyylisulfaatti hajottaa bakteerien solukalvojen proteiinit ja lipidit vapauttaen DNA:n ulos soluista. Natriumhydroksidi denaturoi sekä genomisen- että plasmidi-DNA:n kaksijuosteisesta yksijuosteiseksi, mutta plasmidi-DNA-renkaiden juosteet säilyvät yhteen kietoutuneina liuoksessa (National Centre for Biotechnology Education (NCBE) 2000, hakupäivä 4.10.2012; Macherey-Nagel 2012, hakupäivä 17.6.2012).

Ero näiden kahden plasmidieristysmenetelmien välillä on plasmidien poistamisessa liuoksesta. NCBE:n (2000, hakupäivä 4.10.2012) esittelemässä perinteisemmässä, kuten myös Macherey-Nagelin (2012, hakupäivä 17.6.2012) uudemmantyyppisessä menetelmässä ylimääräiset partikkelit saostetaan liuoksesta kaliumasetaatilla. Tämä saostaa SDS:n kaliumdodekyylisulfaatiksi (KDS), minkä vuoksi proteiinit, kromosomaalinen DNA ja muut solujätteet voidaan erottaa liuoksesta. Kaliumasetaatilla myös neutraloi liuoksen pH:n ja plasmidi-DNA palautuu luonnolliseen, kiertaiseen natiivirakenteeseensa. NCBE:n kuvailema menetelmä perustuu plasmidien etanolisaotukseen. Macherey-Nagel on kehittänyt tämän vaiheen sijalle piioksidihartsia sisältävät eristyspylväät (NucleoBond® Xtra Silica Resin -pylväät). Pylväiden sisältämä piioksidihartsi koostuu hydrofiilistä, huokoisista helmistä, joita on käsitelty metyyliaminoetanolilla. Käsitely saa aikaan pylvään suodattimen pinnalle positiivisen kokonaisvarauksen happamassa pH:ssa. Koska plasmidi-DNA:ssa olevat fosfaattiryhmät (PO_4^-) ovat happimolekyylinsä vuoksi negatiivisesti varautuneita, ne sitoutuvat tähän positiiviseen pinnoitteeseen (Macherey-Nagel 2012, hakupäivä 17.6.2012). Epäpuhtaudet voidaan puhdistaa pylvästä puhdistuspuskureilla, ja lopuksi plasmidi eluoidaan pois pylvästä emäksisellä eluointiliuoksella.

5.2 Solujen steriiliviljely

Lodish ym. (2008, 395–396) kuvailevat eläinsolujen viljelyä laboratorio-oloissa sekä solujen vaatimia kasvuoloja. Siinä, missä bakteerisolut kasvavat usein hyvinkin vaatimattomissa olosuhteissa, täytyy eläinsoluviljelmässä useiden seikkojen mallintaa tämän solun normaalia ympäristöä kudoksessa. Ilman näitä asioita solujen kasvaminen ja normaalit solutoiminnot eivät onnistu. Tällaisia seikkoja ovat esimerkiksi kasvatusliuoksen pH, lämpötila, ionivahvuus sekä solujen tarvitsemat ravintoaineet.

Tärkeintä työmme kannalta oli solujen viljely ilman kontaminaatiota vieraista soluista, bakteereista ja muista organismeista. Soluviljelmien pitämiseen puhtaana on useita tapoja. Kasvatusliuokseen voidaan lisätä antibioottia ehkäisemään bakteerien ja sienien kasvu solualustalla. Lisäksi solujen käsittely olisi hyvä tehdä ilmasuodatetussa laminaarikaapissa. Laminaarikaapin kiertävä ilmavirtaus ehkäisee huoneilman kontaminanteja ja mikro-organismeja pääsemästä soluviljelmiin. (Lodish ym. 2008, 396)

5.3 Lipofektio

Solukalvot muodostuvat fosfolipideistä. Fosfolipideissä glyserolin yhteen hydroksyyli-ryhmään on liittynyt negatiivinen fosfaattiryhmä (PO_4^-), minkä vuoksi fosfolipidin fosfaattipää on hydrofiilinen. Glycerolin kahteen muuhun hydroksyyli-ryhmään on sitoutunut kaksi hydrofobista rasvahappoketjua. Tämän vuoksi biologisissa systeemeissä fosfolipidien rasvahapot muodostavat oman faasin ja hydrofiiliset fosfaattiosat oman faasinsa, muodostaen niin kutsuttuja fosfolipidikalvoja. (Solunetti, 2012c. Hakupäivä 23.8.2012) Liposomit ovat nesteessä kahdesta fosfolipidikerroksesta muodostuvia monikerroksisia, suljettuja vesikkeleitä eli rakkuloita (*engl. multilamellar vesicles*). Negatiivisen DNA:n ja positiivisen liposomin muodostama kompleksi, lipopleksi, pystyy läpäisemään solukalvon ja näin vapauttamaan DNA:n solun sisälle. Ongelmana kuitenkin lipofektion käytössä on sen usein heikko transfektio-efektiviteetti. (Ryhänen 2006, 11, 15) Lodish ym. (2008, 196) mainitsevat, että transfektio-efektiviteetin varmistamiseksi tulee soluun siirrettävää DNA:ta sisältäviä plasmideja lisätä reaktioon riittävästi, jotta suurimpaan osaan soluista transfektoituisi edes yksi plasmidi.

Lipofektion etuna on ennen kaikkea sen turvallisuus verrattuna virusvälitteisiin eli viraalisiin transfektio-omenetelmiin. Kun viraalisissa menetelmissä siirretään myös viruksen perintötekijöitä, lipofektiossa ei siirretä transfektion kannalta ylimääräistä vierasta perimää soluun. Lipofektion yksinkertaisuus tekee siitä myös viraalisia transfektio-omenetelmiä käyttökelpoisemmän, sillä kationisten eli positiivisesti varattujen liposomien ja anionisen eli yleiseltä varaukseltaan negatiivisen DNA:n kompleksien muodostuminen on spontaania ja niiden valmistaminen on yksinkertaisempaa kuin viruskonstruktion. (Ryhänen, 2006. 11, 23–22)

5.4 Solujen induointi

Työssämme selvitimme tapahtuuko E-kadheriinin ilmenemisessä muutoksia, kun MK3-soluja indusoidaan litiumkloridilla, mukautetulla solumediumilla (*engl. conditional media*) ja BIO:lla (6-bromoindirubiini-3-oksiimi). Koska oletimme kirjallisuuden perusteella MK3-solujen mallintavan mesenkymaalista solukkoa, oli näitä soluja indusoimalla mahdollista selvittää niiden erilaistuminen kypsemiksi, epiteeliä muistuttavammiksi soluiksi. Tämän havainnollistamiseksi teimme indusoiduille soluille E-kadheriinivärjäyksen. Osaltaan tämä tutkimustulos vahvistaisi sitä oletustamme, että MK3-solut soveltuisivat mallintamaan mesenkymaalista solukkoa.

Solujen induointi litiumkloridilla

Jamie Daviesin ja David Garrodin tutkimus (1995, 50) osoitti, että Li^+ -ionit voivat indusoida nefrogeesin alkuvaiheita, mukaan lukien epiteelille tyypillisten markkereiden, kuten keratiinin ja desmokolliniinien synteessin. Lisäksi tutkimus osoitti, että Li^+ indusoitu differentiaatio muistutti laajalti reaktiota, joka saadaan aikaan käyttämällä eläviä induktoreita.

Työssämme indusoidimme MK3-soluja kahdella eri litiumkonsentraatiolla, 5 mol/l matalalla konsentraatiolla sekä 15 mol/l korkealla konsentraatiolla.

Solujen induointi BIO:lla

6-bromoindirubiini-3-oksiimi eli BIO inhiboi solujen erilaistumiseen johtavia signaaleja ihmisen ja hiiren kantasoluissa useilla tavoilla, pääasiassa glykogeeni-syntaasi-kinaasi 3:n inhibitiolla (Sigma-Aldrich 2012, hakupäivä 1.10.2012) BIO edistää solujen uudistumista ja edesauttaa soluja pitämään monikykyisyytensä. Glykogeeni-syntaasi-kinaasit 3α ja $-\beta$ (GSK-3 α/β) toimivat erilaistumattomissa soluissa aktiivisena ja inhiboivat esimerkiksi kasvutekijöiden vaikutuksesta (UniProt-tietokanta, hakupäivä 1.10.2012)

Kuure, Popsueva, Jakobson, Sainio ja Sariola (2007, hakupäivä 11.10.2012) esittävät tutkimuksessaan GSK3:n inaktivaation yhteyden rotan munuaisen mesenkymisolukon erilaistumiseen ja Wnt-4-signaalintireitin tekijöihin. Tutkimuksessaan Kuure ym. toteavatkin, että BIO:lla tehty induointi sai aikaan mesenkymaalisolukon runsasta erilaistumista epiteelisolukon suuntaan. Toivomme saavamme aikaan vastaavanlaista erilaistumista MK3 -solulinjan soluilla.

Solujen indusointi mukautetulla solumediumilla

Mukautettu solumedium tarkoittaa kasvatusliuosta, josta on poistettu siinä kasvaneet solut. Liuoksessa kasvaneet solut ovat erittäneet siihen kasvutekijöitä, sytokiinejä, proteiineja ym. kemiallisia yhdisteitä, mitä solut normaalistikin erittävät. Tällaista liuosta voidaan käyttää tutkimuksissa esimerkiksi indusoimaan solujen differentiaatiota. Käyttämässämme mediumissa oli kasvatettu W4MC-solulinjan soluja. W4MC-solulinja erittää mediumiinsa Wnt-4-signaalintireitin tekijöitä. Näiden kasvutekijöiden avulla oli tarkoitus selvittää, onko Wnt-4-signaalintireitin tekijöillä mahdollista saada aikaan MK3-solujen erilaistumista ja lisääntynyttä E-kadheriinin ekspressiota.

5.5 Immunohistokemia

Immunohistokemia yhdistää anatomiset, immunologiset ja biokemialliset tekniikat yhteen, jotta voidaan tunnistaa erilliset kudskomponentit toisistaan. Tunnistus tapahtuu spesifisillä vastaaineilla ja niihin sidotuilla markkerimolekyyleillä. Immunohistokemia mahdollistaa solukomponenttien sijainnin ja jakautumisen visualisoinnin solussa ja kudoksissa. Immunohistokemian tekniikka voidaan jakaa kahteen vaiheeseen: näytteen valmisteluun ja leimaukseen. (Thermo Scientific 2012a. Hakupäivä 21.8.2012)

Fiksaation eli kiinnityksen tarkoituksena on estää autolyysi ja bakteeritoiminta sekä säilyttää tutkittavan kudoksen rakenne mahdollisimman alkuperäisenä siten, ettei siitä häviä molekyylejä jatkokäsittelyjen aikana. Laadukkaan näytteen valmistamiseksi proteiinien hyvä säilyminen on keskeistä, vaikka se saattaa rajoittaa joidenkin erikoistekniikoiden (esimerkiksi immunohistokemian ja histokemian) käyttöä. (Rantala & Lounatmaa 1998, 65)

Eniten käytettyjä fiksatiiveja histologiassa ovat aldehydit, joista yleisin on formaldehydi. Se on kaasu, jonka 37–40 %:sta vesiliuosta kutsutaan formaliiniksi. Fiksaatioon käytetään 10 %:n laimennosta, jossa formaldehydin pitoisuus on 4 %:a. Neutraalissa pH:ssa formaldehydi muodostaa metyleenisidoksia polypeptidiketjujen välille ja stabiloi näin kudospoteiineja. Vesiliuoksessa säilytettävä formaldehydi pelkistyy metanoliksi ja hapettuu muurahaishapoksi. Nämä heikentävät fiksatiivin tehoa ja saattavat aiheuttaa ongelmia erikoistekniikoissa. Puhdas paraformaldehydi on hellävaraisempi fiksatiivi kuin formaliini. Siitä puuttuvat formaliinin epäpuhtaudet, ja puskuroituna sitä käytetäänkin useissa erikoistekniikoissa, kuten immunohistokemiassa ja histokemiassa. (Rantala & Lounatmaa 1998, 65–66)

Vaikka vasta-aineet sitoutuvat ensisijaisesti spesifisiin epitooppeihinsa, voivat ne myös osaksi sitoutua epäspesifisesti muihin epitooppeihin, jotka ovat samankaltaisia kuin kohteena oleva antigeeni. Tämä epäspesifinen sitoutuminen aiheuttaa voimakkaan taustavärjäytymisen, mikä voi peittää kohteena olevan antigeenin havaitsemisen. Taustavärjäyksen vähentämiseksi näytteitä inkuboidaan puskuriliuoksessa, mikä täyttää haitalliset sitoutumiskohdat joihin primaari- tai sekundaarivasta-aine voisi sitoutua. Yleisiä liuoksia tähän käyttötarkoitukseen ovat normaali seerumi, rasvaton maito, BSA eli naudan seerumin albumiini, tai gelatiini. Näiden lisäksi on saatavana kaupallisia puskuriliuoksia. (Thermo Scientific 2012a. Hakupäivä 21.8.2012)

Primaari- ja sekundaarivasta-aine liuotetaan puskuriliuokseen, mikä auttaa stabiloimaan vasta-aineen, helpottaa vasta-aineen tasaista leviämistä koko näytteen alueelle ja vähentää epäspesifistä sitoutumista. Näytteen huuhtelu primaari- ja sekundaarivasta-aineen välillä on tärkeää, jotta sitoutumattomat tai heikosti sitoutuneet vasta-aineet saadaan näytteestä pois. (Thermo Scientific 2012a. Hakupäivä 21.8.2012)

Vasta-aineisiin perustuvat määritysmenetelmät jaetaan suoriin ja epäsuoriin menetelmiin. Suorassa menetelmässä entsyymillä leimattu primaari-vasta-aine reagoi kudosan antigenin kanssa. Substraatin ja kromogeenin lisäys saa aikaan näkyvän sakan. Menetelmä on nopea, eikä epäspesifistä sitoutumista juuri tapahdu. Lopputulos on kuitenkin usein liian niukka. Konjugoitujen primaarivasta-aineiden käyttö on myös epäkäytännöllistä ja kallista. Inkubointi vain yhdessä leimatussa vasta-aineessa tekee menetelmästä epäherkän, eikä sitä juurikaan käytetä. Epäsuorassa menetelmässä näytettä inkuboidaan ensin leimaamattomassa primaarivasta-aineessa. Toisena kerroksena on sekundaarivasta-aine, johon on konjugoitu entsyymi. Kolmannessa vaiheessa entsyymi osoitetaan substraatin ja kromogeenin avulla. Epäsuora menetelmä on suoraa herkempi, koska useita sekundaarivasta-ainemolekyylejä voi liittyä primaarivasta-aineen eri epitooppeihin. Epäsuoran menetelmän etuna on herkkyyden lisäksi se, että monia eri primaarivasta-aineita voidaan käyttää yhdessä saman leimatun sekundaarivasta-aineen kanssa. (Rantala & Lounatmaa, 1998, 144) Useimmat epäsuorat menetelmät käyttävät avidiinin ja biotiinin luontaista affiniteettiä reportterin kiinnittämiseen kohdeantigeeniin ja signaalin vahvistamiseen (Thermo Scientific 2012a. Hakupäivä 21.8.2012).

Immunohistokemiassa kohteena olevat antigeenit havaitaan joko kromogeenisesti tai fluoresoivilla menetelmillä. Fluoresoivassa menetelmässä vasta-aineeseen on konjugoitu fluoroforiksi kutsuttu markkeri, joka voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla. Kromogeeninen detektio perus-

tuu entsyymien aktiivisuuksiin, yleisimmin piparjuuriperoksidaasiin (horseradish peroxidase HRP) tai alkaliseen fosfataasiin (AP), jotka muodostavat värillisen liukenemattoman sakan substraateista. (Thermo Scientific 2012a. Hakupäivä 21.8.2012)

Kun näytteet on valmistettu, voidaan niitä tarkastella valo- tai fluoresenssimikroskoopilla. Riippuen valitusta menetelmästä ja käytetyistä vasta-aineista, voidaan käyttää myös konfokaalimikroskooppia. (Thermo Scientific 2012a. Hakupäivä 21.8.2012)

5.6 Mikroskopointi

Useimmissa nykyaikaisissa fluoresenssimikroskoopeissa on päältävalojärjestelmä. Päältävalofluoresenssijärjestelmässä herätevalon teho saadaan hyödynnetyksi, koska valo ei kulje monien lasilinssien läpi. Myöskään immersioöljyä ei tarvita kondensorin päällä. Linssit, joissa on korkea numeerinen aperttuuri, antavat intensiivisen fluoresenssin. Päältävalofluoresenssijärjestelmään kuuluu olennaisena osana dikromaattinen peili, joka ensin heijastaa herätevalon näytteeseen, ja sen jälkeen päästää emittoidun valon lävitseen okulaareille. Eri fluorokromit vaativat peileiltä omat valon heijastus/läpäisyominaisuutensa. Käytössä käteväksi on osoittautunut fluoresenssiosaan asennettu suodinblokki, jossa on sekä herätevalo- että suojasuodin ja dikromaattinen peili. Tällaisen suodinblokin voi varustaa kahdelle tai kolmellekin fluorokromille, jolloin kaksoisvärjäyksen mikroskopointi sujuu vain blokin asentoa muuttamalla. Oikea suodinjärjestelmä on keskeinen fluoresenssimikroskopiassa. Herätevalon suodin, jolla rajataan aallonpituus, sekä suojaestesuodin, joka estää herätevalon joutumisen okulaareille, ovat välttämättömät. Valolähteen jälkeen asetetaan tavallisesti myös lämpö- ja infrapunasuotimet absorboimaan valolähteen tuottamaa lämpöä. (Rantala & Lounatmaa 1998, 141–142)

Konfokaalimikroskopiassa perinteinen fluoresenssimikroskooppi on liitetty tietokoneeseen. Herätevalolähteenä on laser ja lasersuihkulla pyyhitään immunofluoresenssi-näytteen eri kerroksia. Näin muodostuneet kuvat tallennetaan tietokoneeseen. Näytteen eri tasoilta otettuja kuvia voidaan tarkastella monin tavoin – esimerkiksi päällekkäisinä tai kolmiulotteisesti. (Rantala & Lounatmaa, 1998, 141–142)

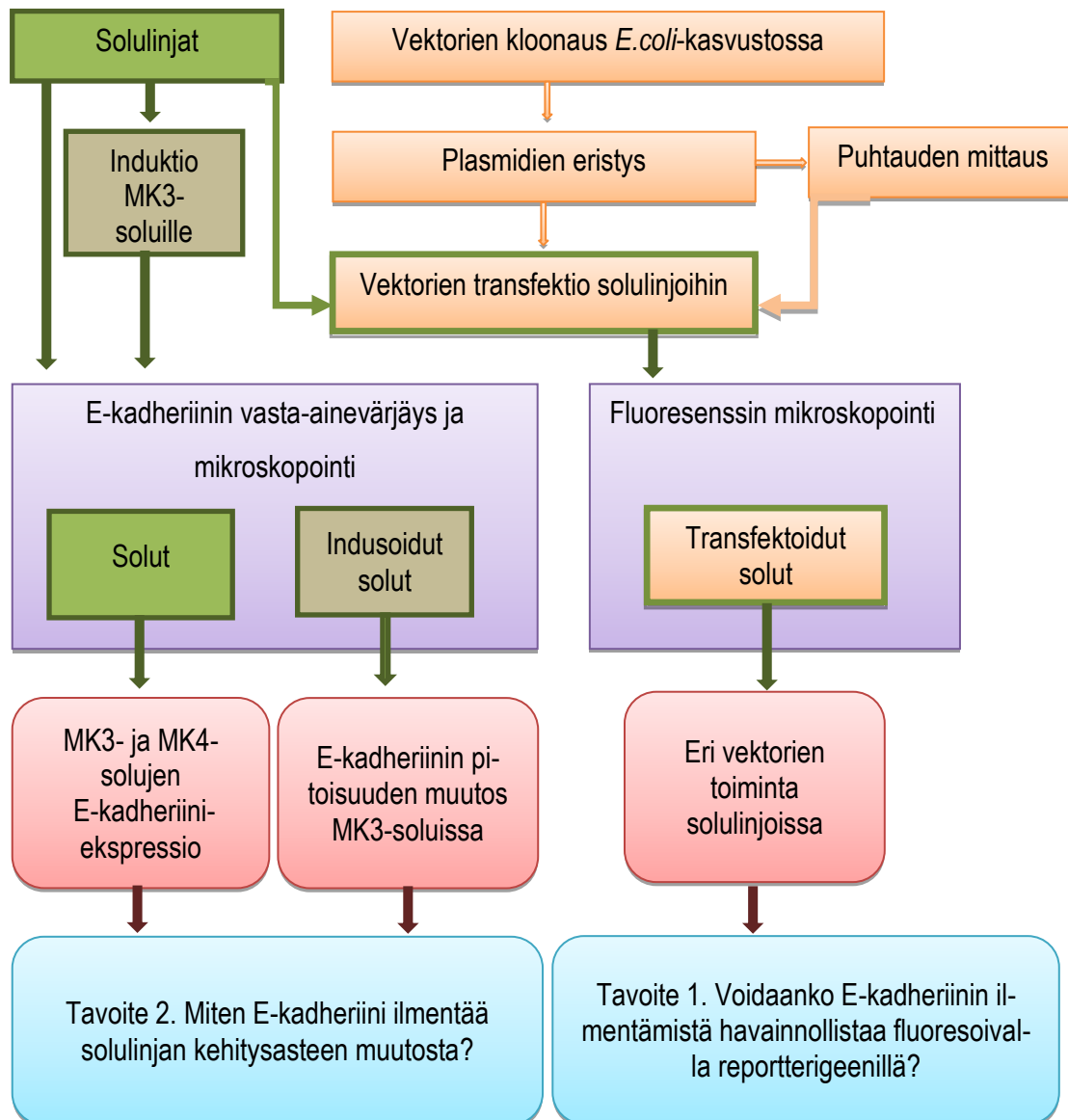
Konfokaalimikroskopiassa kuvan digitaalisella tallennuksella on oma osuutensa kuvantamisessa. Mikroskoopin näkymän tallentamisessa digitaaliseen muotoon voidaan useilla kuvan tallennusmenetelmään vaikuttavilla säädöillä tehdä suuria eroja tallennetun kuvan laatuun. Esimerkkinä

Ronkainen (14.3.2012, haastattelu) kertoi yhden pikselin tallentamiseen käytetystä ajasta (pikseliaika). Mahdollisimman tarkan kuvan saamiseksi konfokaalimikroskoopilla voidaan taltioida mikroskoopin näkymää pikseli kerrallaan. Kuitenkin mitä pitempi aika käytetään yhden pikselin taltioimiseen, sitä suuremmaksi kasvaa digitaalisen kohinan eli muualta kuin näytteestä peräisin olevan signaalin (*engl. noise*) osuus näyteperäisestä signaalista. Tätä kutsutaan signal/noise -suhteeksi (*engl. signal/noise -ratio*). Toisaalta siis pidennettäessä pikselin kuvantamiseen käytettävää aikaa saadaan tallennettua parempi signaali, mutta samalla tallentuu myös enemmän kohinaa. Tämän seikan vuoksi Ronkainen suositteli pitämään pikseliajan suhteellisen lyhyenä, esimerkiksi 10 μ s/pikseli. Etuna lyhyessä pikseliajassa on myös tallentumisen nopeutuminen, sillä suhteellisen pienen resoluution, 1024x1024 -pikselin kuvan tallennuksessa viiden mikrosekunnin ero pikseliajassa aiheuttaa viiden sekunnin eron koko kuvan tallennuksessa. Luonnollisesti resoluution kasvaessa kasvaa myös kuvan tallennukseen käytettävä aika.

Ronkaisen mukaan mikroskopoidessa fluorokromeja sisältäviä näytteitä täytyy huolehtia fluorokromien liiallisesta valolle altistumisesta johtuvasta signaalin heikentymisestä. Signaali voi heiketä myös mikroskopointivaiheessa, esimerkiksi käyttämällä laser-valoa liian suurella teholla. Usein esimerkiksi 3 %:n teho laserin kokonaistehosta on riittävä hyvänlaatuisen signaalin aikaansaamiseksi (Ronkainen 14.3.2012, haastattelu).

6 TYÖN TOTEUTUS

Työmme koostui useista eri vaiheista. Näitä olivat vektorien kloonaukset *E.coli*-kasvustossa, plasmidien eristys ja transfektio eukaryoottisoluihin. Lisäksi teimme MK3-solulinjalle induktiokokeen eri induktoreilla. E-kadheriinin ekspressiota tarkkailimme indusoimattomissa ja indusoiduissa soluissa vasta-ainevärjäyksellä, ja transfektoidujen vektorien toimintaa arvioimme niiden synnyttämän fluoresenssisignaalin avulla. Kaikki mikroskopoinnit teimme Biocenter Oulun omistamalla konfokaalimikroskoopilla. Työvaiheet on esitettyä kuviossa 4.



KUVIO 4. Työvaiheet

6.1 Plasmidi-DNA:n monistus ja eristys

Plasmidien transfektiota varten halusimme monistaa plasmidia suurempia määriä, jotta valmistetut konstruktit eivät loppuisi kesken myöhemmissäkään tutkimuksissa. Monistuksen teimme bakteerimonistamisella. Yön yli kasvatuksen jälkeen bakteerit hajotettiin ja plasmidit eristettiin soluviljelmästä.

Monistus

Monistimme *E.coli*-bakteerikannassa viittä eri plasmidia. Plasmidit ja niitä vastaavat lyhenteet ovat esitettyinä taulukossa 1. Bakteereita kasvatettiin yön yli 37 °C:een lämpötilassa LB-kasvatusmediumissa, jonka ampicilliinipitoisuus oli 50 µg/ml.

TAULUKKO 1. Työssä käytetyt plasmidit ja niiden lyhenteet.

<i>Nimi</i>	<i>Lyhenne</i>
Plasmidi, jossa E-kadheriinin lyhyt promoottori + YFP	pEcadS
Plasmidi, jossa E-kadheriinin lyhyt promoottori + enhancer-jakso + YFP	pEsen
Plasmidi, jossa E-kadheriinin pitkä promoottori + YFP	pEcadL
Plasmidi, jossa E-kadheriinin pitkä promoottori + enhancer-jakso + YFP	pELen
CMV-vektori + YFP	CMV

Eristys

Plasmidieristuksen teimme Macherey-Nagelin NucleoBond Xtra Maxi -paketilla. Noudatimme pääsääntöisesti valmistajan ohjetta, mutta teimme muutaman poikkeuksen. Tutkimusryhmä oli tehnyt joitain huomioita pakettia käyttäessään ja he olivat tämän perusteella muuttaneet tiettyjä vaiheita eristysprosessista. Nämä kohdat liittyivät sentrifugointiaikoihin ja käytännön järjestelyihin työn edetessä, esimerkiksi reagenssien lämmittämiseen. Noudatimme näissä tapauksissa tutkimusryhmän merkkejä kohtia. Lisäksi valmistaja esittää työohjeessaan useita erilaisia vaihtoehtoja tilanteisiin, joissa pakkausta voi käyttää. Valitsimme näistä tilanteista omaa eristettävää plasmidiamme vastaavat vaihtoehdot. Eristyksen työvaiheet on esitettyinä liitteessä 1.

Puhtauden ja konsentraation mittaus

Testasimme eristetyistä näytteistä DNA:n puhtauden sekä konsentraatiot, sillä nämä tekijät täytyi ottaa huomioon seuraavassa työvaiheessa, transfektiossa. Nukleotidit, RNA ja DNA absorboivat UV-valoa 260 nm:n aallonpituudelta, kun taas proteiinit, fenolit tai muut epäpuhtaudet absorboivat parhaiten valoa 280 nm:n aallonpituudelta. Jos näytteestä mitataan absorbanssit molemmilta aallonpituuksilta, saadaan 260/280nm -suhteesta arvioitua näytteen puhtaus. Puhtaalle DNA-näytteelle suhde on noin 1,8 (NanoDrop Technologies 2007, hakupäivä 14.10.2012). Mittasimme eristetyistä plasmidi-DNA:sta absorbanssit 260 nm:n ja 280 nm:n aallonpituuksilla konsentraation ja puhtauden määrittämiseksi käyttäen Thermo Scientificin NanoDrop -laitetta. Mittaustulokset on esitettyinä taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Plasmidi DNA:n absorbanssimittaukset.

Näyte	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Konsentraatio (ng/ μ l)
CMV	38,622	20,316	1,90	1931,1
pEsen	59,086	30,847	1,92	2954,3
pElen	22,209	11,710	1,90	1110,5
pEcadS	29,716	30,930	1,93	2985,8
pEcadL	51,614	27,894	1,85	2580,7

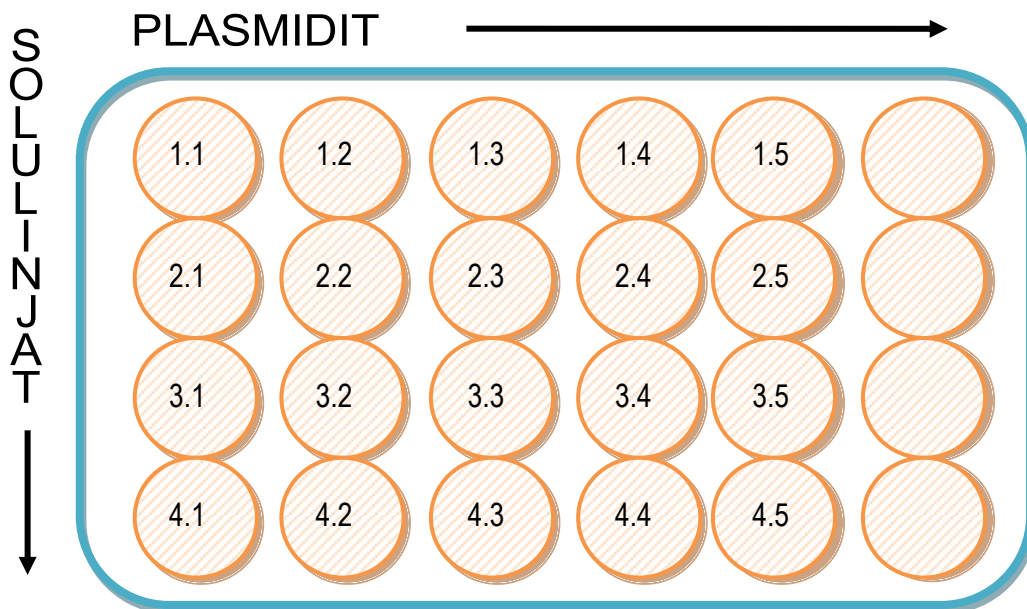
Absorbanssisuhteesta 260/280 voimme päätellä, että olimme onnistuneet eristämään suhteellisen puhdasta DNA:ta. Optimi puhtaalle DNA:lle on NanoDrop Technologiesin (2007, hakupäivä 14.10.2012) mukaan noin 1,8. Mitattavan DNA:n nukleiinihappokoostumus vaikuttaa A260/280-suhteeseen (adeniini ja urasiili suhdelukua nostavasti, tyymiini ja guaniini suhdelukua laskevasti). Olimme erittäin tyytyväisiä puhdistuksen tuloksiin.

Lopuksi liuotimme eristyksen tuotteena saadut plasmidi-DNA:t 200 μ l:aan TE-puskuria eppendorfputkissa, ja pakastimme ne -21 °C:een jatkoa varten.

6.2 Transfektio

Teimme transfektion Rochen X-tremeGene 9-reagenssilla. Transfektion onnistumiseksi Roche Diagnostics (2011, hakupäivä 4.10.2012) suosittelee optimoimaan reagenssin ja transfektoitavan DNA:n suhteen. Optimaalisen konsentraation saavuttamiseksi meidän täytyi laimentaa näytteitä vastaamaan plasmidi-DNA-pitoisuudeltaan valmistajan ilmoittamaa optimipitoisuutta, jotta saisimme lisättyä reagenssia ja näytettä optimisuhteessa. Tässä vaiheessa käytimme aikaisemmin mittaamiemme näytteiden absorbanseja, joiden avulla saatiin selville jokaisen näytteen plasmidi-DNA-konsentraatio. Laimennukset on esitettyä liitteessä 2.

Transfektiossa pipetoimme valmistajan ohjeiden mukaisesti X-tremeGene 9-reagenssia laimennusliuokseen (TE-puskuri) ja lisäsimme laimennettua DNA:ta optimisuhteessa 1 mikrogramma näyte-DNA:ta 3 mikrolitraan transfektio-reagenssia. Lopputilavuus transfektio-liuokselle oli 100 mikrolitraa. Annoimme näytteiden ja reagenssin inkuboitua huoneenlämmössä noin 15 minuuttia, jonka jälkeen pipetoimme liuosta tipoittain soluviljelmiin. Jokaisen neljän eri solulinjan soluja transfektoitiin erikseen viidellä eri vektorilla. Näin saimme yhteensä 20 erilaista transfektoitua solulinjaa. Transfektio-kaavio on esitetty alla olevassa kuviossa 5.



KUVIO 5. Transfektio-kaavio soluista ja plasmideista 24-kuoppalevyllä

6.3 Immunohistokemia

Immunologiset värjäykset suoritettiin prof. Jingdong Shanilta saamamme työohjeen mukaisesti (liite 3). Työssä käytetyn fosfaattipuskuroidun suolaliuoksen (PBS) pH oli 7.4. Solut kiinnitimme näytelaseihin 4 %:lla paraformaldehydillä (PFA). Epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi näytelaseille lisättiin 2 %:sta fetal bovine serum/PBS-liuosta. Käyttämämme primaarivasta-aine oli BD Transduction Laboratoriesin valmistama Purified Mouse Anti-E-cadherin eli puhdistettu hiiren anti-E-kadheriini. Sekundaarivasta-aine oli yleinen kaupallinen jäniksessä tuotettu anti-hiiri-vasta-aine. Käytimme myös kaupallista Hoechst-tumaväriainetta, mikä värjäsi solujen tumat siniseksi mikroskopoinnin helpottamiseksi.

6.4 Mikroskopointi

Mikroskopoimme kaikki näytteet Biocenter Oulun omistamalla Olympus Fluoview FV1000-konfokaalimikroskoopilla. Koska kyseinen mikroskooppi oli meille entuudestaan tuntematon, saimme asiantuntija-apua mikroskoopin käytöstä ja ominaisuuksista tohtori Veli-Pekka Ronkaiselta. Teimme kahdentyyppisiä näytteitä: vasta-ainevärjättyjä, joihin oli lisättyä fluorokromit, sekä näytteitä, joista halusimme tarkastella solujen itsensä tuottamaa fluoresoivaa signaalia. Näitä molempia pystyimme tarkastelemaan samalla mikroskoopilla.

Konfokaalimikroskoopin täysin manuaalinen käyttö on haastavaa jopa asiantuntijoille. FV1000-mikroskoopissa oli kuitenkin mahdollisuus valita myös valmiiksi optimoiduista värjäysspesifeistä asetuksista. Näissä asetuksissa mikroskooppi säätää itsenäisesti optiset osat, kuten esimerkiksi peilit, vastaamaan valitun värin eksitaatio- ja emissiomaksimeja. Valitsimme meidän anti-mouse-väriainettamme lähimpänä olleen Alexa 546:n fluorokromin asetukset anti-E-kadheriinivärjäykselle sekä Hoechst-fluorokromin asetukset Hoechstilla värjättyjen tumien visualisoinniseksi. Transfektioitujen solujen tuottaman YFP-fluoresenssisignaalin asetuksiksi valitsimme YFP-asetuspaketin.

Vaikka mikroskooppi säätää itsenäisesti optiset osansa, tuli meidän silti asettaa useita muuttujia, kuten esimerkiksi laserin tehoa ja voimakkuutta, vastaamaan näytteiden emittoimaa signaalia. Tärkein vaihe vasta-ainevärjättyjen näytteiden tarkastelussa oli säätää mikroskoopin lasertehot vastaamaan kontrollinäytteen epäspesifiä sitoutumista. Näin asetimme ns. nollatason signaalin eli ne tehot, joilla saatiin epäspesifin sitoutumisen signaali mahdollisimman pieneksi. Nollatason te-

hoilla mikroskopoitujen näytteiden signaalit olisivat näin automaattisesti spesifistä sitoutumista. Nollatason valinnan jälkeen emme saaneet muuttaa asetuksia, sillä jos esimerkiksi tehoja nostettaisiin joka näytteen välillä, saataisiin suurempia signaaleja (eli virheellinen positiivinen tulos), vaikka tosiasiallisesti fluoresenssin signaali olisi huomattavasti heikompi kuin nollatasolla. Epäspesifisen sitoutumisen lisäksi täytyi kiinnittää huomiota taustaan. Taustan ”mustuuden” säädimme *offset*-asetuksella, sillä vaikka musta näyttikin mustalta tietokoneen ruudulla, se oli hyvin usein tummaa harmaata ja olisi vääristänyt signaalien vahvuutta.

7 TULOKSET

Tehtävänäimme oli selvittää, voidaanko E-kadheriinien ilmenemistä havainnollistaa reportterigeenikonstruktilla ja näin havainnollistaa mesenkymaalisen solun muuttumista epiteelisoluksi *in vitro*. Työssä käytettiin neljää eri solulinjaa: CHO-soluja, MK3- ja MK4-soluja sekä W4MC-soluja, sekä neljää erilaista reportterikonstruktiota.

Koska tekemämme työ oli luonteeltaan kokeellinen eikä vastaavaa koetta ollut tietävästi aiemmin tutkimusryhmässä tehty, pyrimme selvittämään myös, miten hyvin E-kadheriinien ilmeneminen solukalvolla korreloi solujen kehityslinjan muutokseen. Tätä tutkimme tekemällä E-kadheriinien vasta-ainevärjäykset kahdelle eri kehitysvaiheeseen kuuluneelle solulinjalle (MK3- ja MK4-solut).

Lisäksi selvitimme, miten E-kadheriinien ilmeneminen muuttuu, kun solut indusoidaan eri induktoreilla (litiumkloridi, mukautettu solumedium, BIO).

7.1 Solujen E-kadheriini-ekspressio

MK3- ja MK4 -soluille tehtiin E-kadheriinien vasta-ainevärjäys, jotta voitiin tarkkailla solujen pinnalla ilmenevää E-kadheriinimolekyylin ilmentymistä. Valeriuksen, Pattersonin, Witten ja Potterin mukaan MK3-solut ovat indusoimattoman mesenkymaalisten solujen kaltaisia (2002, 159), joten niiden ei tulisi liiemmin ilmentää E-kadheriiniä, minkä Behrens ym. ovat todenneet olevan epiteelikutoksen markkeri (1991, 11495). MK4-solut edustavat kehitykseltään myöhempää, indusoitua metanefristä mesenkymia, joka on aloittanut muuttumisen epiteelisolukoksi (Valerius ym. 2002, 160). Värjäyksen kuvat ovat esitettynä liitteessä 4.

Vasta-ainevärjäyksen onnistumisen kontrolloimiseksi suoritettiin värjäykset ilman primaaria vasta-ainetta. Tällöin pystyttiin havaitsemaan, mikäli sekundaarinen vasta-aine olisi osoittanut ei-toivottua epäspesifistä sitoutumista. Tällöin se olisi näkynyt punaisena signaalina solujen pinnassa. Kontrolleissa ei havaittu epäspesifistä värjäytymistä (kuvat 11 ja 14).

Vasta-ainevärjäyksen tuloksena selvisi, että kirjallisuusviitteistä poiketen käyttämämme MK3-solut ilmensivät pinnallaan jonkin verran E-kadheriiniä (kuva 12). MK4-solujen E-kadheriinien vasta-ainevärjäyksen tulos jäi osin kyseenalaiseksi, sillä emme saaneet värjäyksestä E-kadheriiniä

ilmenemiseen viittaavaa signaalia esiin (kuviot 14, 15 ja 16). Todennäköinen syy yksittäiselle vasta-ainevärjäyksen epäonnistumiselle on pipetointivirhe. On myös mahdollista että kirjallisuusviiteistä poiketen käyttämämme MK4-solulinja ei ilmennä E-kadheriinia solujen pinnalla.

Käyttämämme W4MC-solulinjan soluilla ei värjäyksen perusteella ollut E-kadheriinimolekyylejä solujen pinnalla (kuvio 18).

7.2 Transfektoidut solut

Teimme käytössä olleille solulinjoille (MK3, MK4, CHO, W4MC) transfektiot, joissa soluihin siirrettiin eri reportterikonstrukteja. Näin pystyimme vertaamaan eri konstruktioiden toimivuutta sekä keskenään että eri solulinjoissa. Transfektoidujen solujen kuvat ovat esitettynä liitteessä 5.

Transfektioimme kaikkiin käytössä olleisiin solulinjoihin CMV-vektorin, jossa oli YFP-geeni transfektion onnistumisen kontrolloimiseksi. CMV-vektori ekspressoisi hyvin tehokkaasti siihen liitettyä markkeria, joten transfektion onnistuessa kontrolleista havaitaan voimakas signaali. Kaikkiin solulinjoihin transfektoidut CMV-vektorit antoivat selvän fluoresoivan signaalin (kuviot 20, 25, 30 ja 35), josta päätelimme, että transfektiossa vektorin siirtäminen solun sisälle onnistui ja transfektioagenssi toimi odotetusti.

Vektoreilla saadut tulokset

pEcadS-plasmidissa oli E-kadheriinin lyhyt promoottori sekä signaalin tuottava YFP-geeni. pEcadS-konstruktio ei tuottanut havaittavaa signaalia yhdessäkään käyttämistämme solulinjoista (kuviot 23, 28, 33 ja 38).

pEsen-plasmidissa oli E-kadheriinin lyhyt promoottori, tehostajajakso sekä YFP-geeni. pEsen-konstruktio ei tuottanut signaalia CHO-soluissa (kuvio 24), mutta heikon signaalin MK3-soluissa (kuvio 29). Emme havainneet MK4- ja W4MC-solulinjoissa fluoresoivaa signaalia. (kuviot 34 ja 39).

pEcadL-plasmidissa oli E-kadheriinin pitkä promoottori sekä signaalin tuottava YFP-geeni. Konstruktio tuotti hyvin heikosti havaittavan signaalin CHO- ja MK3-soluissa (kuviot 21 ja 26). MK4-soluihin transfektoidu pEcadL-plasmidi tuotti selvän kirkkaan fluoresenssin (kuvio 31). W4MC-soluissa emme havainneet fluoresenssia (kuvio 36).

pElen-plasmidissa oli E-kadheriinin pitkä promoottori, tehostajakaso sekä YFP-geeni. Plasmidi tuotti heikon signaalin CHO-solulinjassa (kuvio 22). Muissa solulinjoissa emme havainneet fluoressianssia (kuviot 27, 32 ja 37).

Lipofektio menetelmällä toteutetun transfektion transfektio tehokkuus on usein heikko (Ryhänen 2006, 15), mikä näkyi kontrollitransfektioiden alhaisena transfektio määränä (plasmidi oli siirtynyt vain muutamien solujen sisään useimpien jäädessä transfektioitumatta). Alhainen transfektio tehokkuus vaikeutti tulosten tulkintaa huomattavasti. Onnistuneen transfektion löytämiseksi objektilasilta joutui usein tarkastamaan koko objektilasilla olleen solumäärän. Tutkimuksellisesti olisi myös ollut mahdollista laskea transfektio tehokkuus kvantitatiivisesti, mutta emme katsoneet sen olevan työn kannalta tarpeellista.

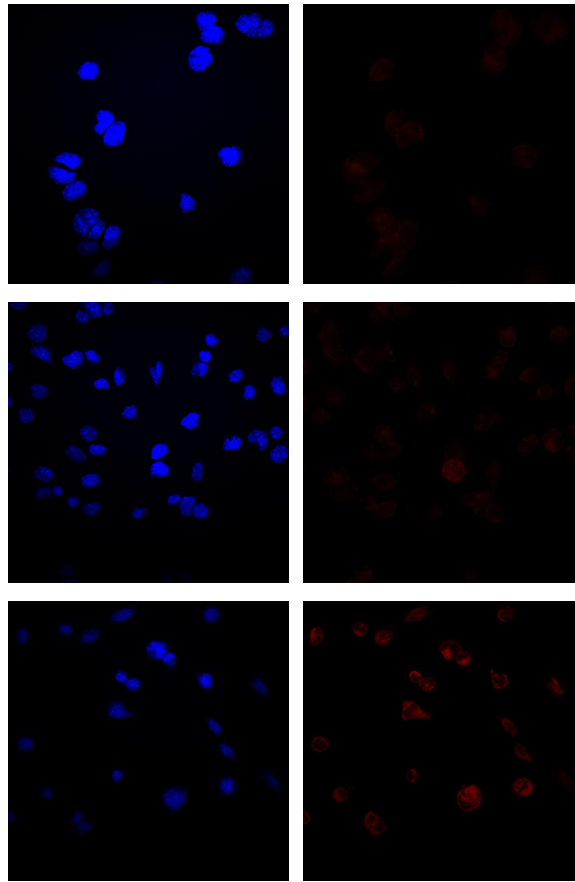
Parhaan lopputuloksen antoi konstrukti pEcadL, missä oli E-kadheriinia koodaavan geenin promoottori sekä YFP-signaalin tuottava geeni.

7.3 Indusoitujen solujen E-kadheriiniekspressio

Pyrimme havainnollistamaan MK3-solujen indusoinnilla E-kadheriiniekspression määrän muuttamista. Lähtöoletuksemme oli, että mikäli MK3-solut alkavat indusoinnin seurauksena muuttua, myös E-kadheriinin ekspressio lisääntyisi. Indusoitujen solujen kuvat ovat esitettynä alla olevissa kuvioissa sekä suurempana liitteessä (liite 6).

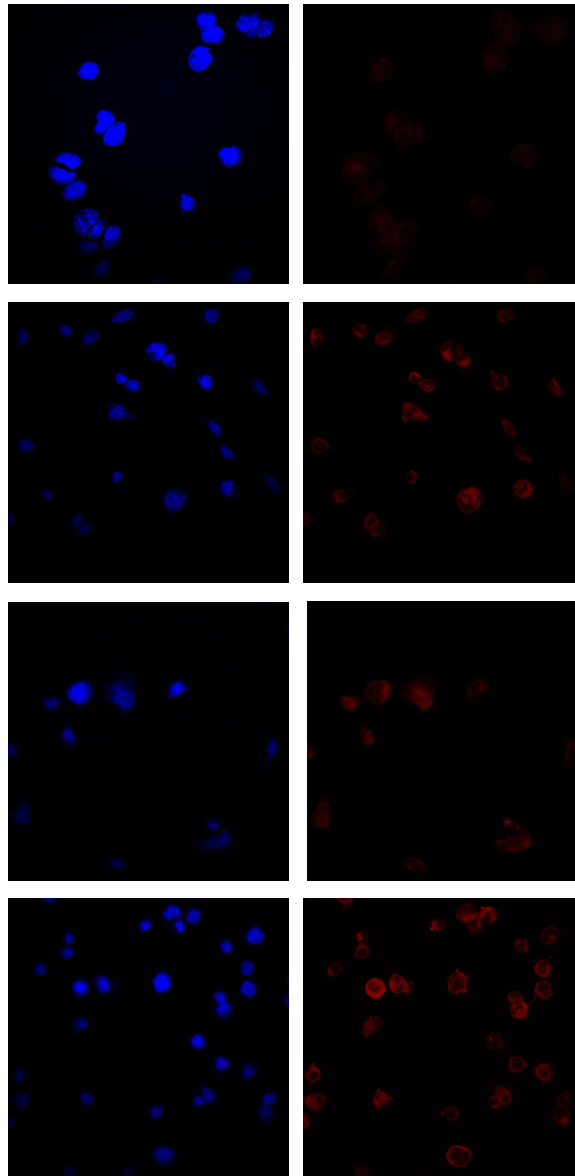
Vasta-ainevärjäyksen onnistumisen kontrolloimiseksi teimme kontrollivärjäyksen ilman primaaria vasta-ainetta. Tällöin pystyimme havaitsemaan, mikäli sekundaarinen vasta-aine olisi osoittanut ei-toivottua epäspesifistä sitoutumista. Tällöin se olisi näkynyt punaisena signaalina solujen pinnassa. Kontrollissa emme havainneet epäspesifistä värjäytymistä (kuvio 11).

Indusoinimme soluja litiumkloridilla kahdella eri konsentraatiolla (matala 5 M ja korkea 15 M) ja suoritimme E-kadheriinin vasta-ainevärjäykset. Indusoimaton MK3-solulinja ilmensi E-kadheriinia heikohkosti, ja E-kadheriinin ekspressio lisääntyi litiumkloridilla indusoidessa konsentraation kasvaessa vastaavasti. Ekspression lisääntyminen on esitetty kuviossa 6.



KUVIO 6. Vasta-ainevärijäys litiumkloridilla indusoiduille MK3-soluille. Ylimmässä kuvaparissa on indusoimattomat MK3-solut, keskellä matala konsentraatio litiumkloridia, ja alhaalla korkea konsentraatio.

MK3-soluja indusoiitiin myös mukautetulla kasvumediumilla sekä BIO:lla. Tarkkailimme indusoitujen solujen E-kadheriiniekspression määrää vertaamalla näytteitä kontrollinäytteeseen. Mukautetulla solumediumilla indusoidut solut ilmensivät E-kadheriinia hieman enemmän kuin indusoimattomat solut, ja BIO osoittautui käytetystä kolmesta induktorista voimakkaimmaksi. Indusoimattomat, korkealla litiumkloridilla, mukautetulla solumediumilla ja BIO:lla indusoidut solut ovat esitettynä alla olevassa kuviossa 7.



KUVIO 7. Solujen indusoinnit. Ylimmässä kuvassa on indusoimaton MK3-solulinja. Seuraavassa kuvassa on solujen induktio litiumkloridilla (korkea konsentraatio), kolmannessa indusointi muokautetulla mediumilla ja alakuvassa indusointi BIO:lla. Käytetyistä induktoreista BIO antoi voimakkaimman vasteen.

7.4 Tulosten arviointi

Tärkeimpänä tutkimustavoitteemme oli selvittää, voidaanko E-kadheriinin fluoresenssiin perustuvalla reportterikonstruktilla havainnollistaa MET-ilmiötä *in vitro* (tavoite 1). Vastataksemme tähän kysymykseen meidän täytyi vastata ensin kaikkiin asettamiimme tavoitteisiin.

Yksi näistä tavoitteista oli selvittää käyttämiemme solulinjojen toimivuus MET-ilmiön kuvaamisessa sekä se, miten hyvin E-kadheriinin ilmeneminen solukalvolla kuvastaa solujen kehityslinjan muutosta. Lähtöoletuksemme oli, että E-kadheriinin ekspressio lisääntyisi siirryttäessä MK3-solulinjasta MK4-solulinjaan. Solulinjoille tekemistämme vasta-ainevärjäyksistä selvisi, että MK3-solujen pinnalla esiintyy jonkin verran E-kadheriinia. Koska E-kadheriini on olennainen osa epi-teelisolujen pintarakennetta, päättelimme, että käyttämämme MK3-solulinja ei tältä osin mallintanut varhaista mesenkyymaalista solukkoa. Vastaavasti MK4-soluille tekemästämme vasta-ainevärjäyksestä emme löytäneet E-kadheriinin ilmentämiseen viittaavaa signaalia. Syyksi epäilimme yksittäistä pipetointivirhettä jossain värjäyksen työvaiheista tai sitä, etteivät solut vain jostain syystä ilmentäneet E-kadheriinia. Tutkimuksemme perusteella voimme vastata, että E-kadheriinin ilmeneminen ei kuvasta solutyypin muutosta täydellisesti ainakaan MK3- ja MK4-solulinjoissa. Tältä osin lopputulokset poikkesivat lähtöoletuksesta ja jäivät vaillinaisiksi. (tavoite 2 ja tavoite 2.1)

Lisäksi tavoitteenamme oli saada vastaus siihen, miten E-kadheriinin ilmeneminen soluissa indusoinnin seurauksella muuttuu. Lähtöoletuksemme oli, että E-kadheriinin ekspressio lisääntyisi käyttämillämme induktoreilla. Indusoimme MK3-soluja kolmella eri induktorilla (litiumkloridi, mukautettu solumedium, BIO), minkä jälkeen teimme soluille vasta-ainevärjäykset. Verrattaessa indusoitujen solujen E-kadheriinin ekspressiota indusoimattomaan MK3-solulinjan kuvaan huomasimme, että E-kadheriinin ekspressio solukalvoilla lisääntyy käyttämillämme induktoreilla. Vastauksemme tutkimustemme perusteella on, että induointi aiheuttaa solujen E-kadheriiniekspressioon muutoksen, jossa E-kadheriinin ekspressio lisääntyy indusoinnin vaikutuksesta. Lisäksi saatoimme tehdä karkean ryhmittelyn induktoreille niiden induktiotehokkuuden perusteella. Kokeilemistamme induktoreista heikoin oli litiumkloridi ja tehokkain BIO. Huomasimme myös, että induktion voimakkuus oli verrannollinen käyttämäämme induktorin määrään. Indusoinnilla lisääntyvä E-kadheriiniekspressio viittaisi siihen, että MK3-solut olisivat sopivia solumuutoksen mallintamisessa. (tavoite 2 ja tavoite 2.2)

Vastataksemme siihen, voiko reportterigeenikonstruktilla havainnollistaa E-kadheriinin ilmenemistä transfektoimme neljä erilaista fluoresoivalla markkerilla varustettua vektoria solulinjoihin. Tällä saimme selville, miten hyvin eri vektorit ilmentävät solujen E-kadheriinin ekspressiota. Teke-miemme mikroskopointikuvien mukaan parhaan lopputuloksen antoi konstrukti pEcadL, missä oli E-kadheriinia koodaavan geenin pitkä promoottori sekä fluoresoivan signaalin tuottava geeni. Konstrukti pEcadL tuotti heikosti havaittavan signaalin kontrollina käytetyissä CHO-soluissa ja

MK3-soluissa, sekä kirkkaan fluoresenssin MK4-soluissa. Saamamme tulos oli positiivinen yllätys, sillä muut käyttämämme vektorit eivät toimineet vastaavasti. Yhtenä syynä vektorien toimimattomuuteen epäilimme, että vektorikonstruktioiden koko voi olla liian iso lipofektiomenetelmällä tehdyille transfektiolle. Voimme kuitenkin tutkimuksemme perusteella vastata, että ainakin pitkän E-kadheriinin promoottorin sisältävä vektori voisi toimia E-kadheriinin ekspression ilmentämisessä (tavoite 1).

Tutkimustuloksista tekemämme johtopäätökset eivät ole yksiselitteisiä. Fluoresoiva E-kadheriinin ekspressiota ilmentävä reportterigeenikonstruktio voisi mielestämme toimia mesenkymaalisen solukon muutosta epiteelisoluksi kuvaavana ilmaisimena, sillä tutkimuksessamme saimme osoitettua E-kadheriinin lisääntymisen erilaistumisessa indusoinnin avulla sekä vektorin toimivuuden E-kadheriinin osoittajana. Jotta reportterigeenikonstruktio voitaisiin käyttää, täytyisi kuitenkin toistaa solumallien E-kadheriininjärjestys. Tällä voitaisiin varmistua solumallien toimivuudesta MET-ilmion kuvaamisessa, sillä tutkimuksemme tulokset poikkeavat tältä osin kirjallisuudesta löytyvistä viitteistä. Lisäksi vektoreiden transfektiotehokkuutta voisi pyrkiä lisäämään esimerkiksi tiheämällä solukasvustoilla. Myös vektorin transfektoiminen pysyväksi osaksi solun perimää voisi vahvistaa soluista saatavaa E-kadheriinin signaalia.

8 POHDINTA

Opinnäytetyömme aihe oli hyvin mielenkiintoinen ja ajankohtainen. Viitekehystä tehdessämme artikkelitietokantoihin ilmestyi uusia aiheeseen liittyviä artikkeleita lähes päivittäin ja tutkimusalan kehitys näytti huimaavan nopealta. Viimeisimmät huomattavat huomionsoitukset genetiikan tutkimukselle ovat vuoden 2012 lääketieteen Nobel-palkinto, jonka saivat Sir John B. Gurdon ja Shinya Yamanaka havainnostaan, että elimistön kypsät solut voidaan ohjelmoida uudelleen pluripotentiksi soluiksi sekä kemian Nobel-palkinto, jonka saivat Robert J. Lefkowitz ja Brian K. Kobilka tutkimuksestaan G-proteiinikytkentäisten reseptorien toiminnasta. G-proteiinireseptorit ovat ryhmä reseptoreja, jotka välittävät solulle tietoa ympäristöstä, jotta solu voi mukautua muuttuviin oloihin. (Nobel-palkinnot 2012. Hakupäivä 18.10.2012)

Vainion tutkimusryhmä on tutkimuksissaan pystynyt identifioimaan parikymmentä eri transkriptiofaktoria, jotka vaikuttavat munuaisen nefronin kehityksessä. Näiden kaikkien tarkan roolin selvittäminen vaatisi kuitenkin valtavan työn mm. hiirimalleja kehitettäessä. Opinnäytetyössä saamiemme rohkaisevien tulosten pohjalta tutkimusryhmä saattoi edetä suunnittelemaan testaamilamme vektoreilla tehtävää pysyvää transfektiota solukannalle, minkä tarkoituksena on pystyä lopulta tekemään seulontatestejä transkriptiofaktoreille. Seulontatesteillä voitaisiin helposti vähentää potentiaalisten transkriptiofaktoreiden määrää.

Laissa koe-eläinten käytöstä sanotaan, että eläinkoe on korvattava muulla menetelmällä, mikäli vastaava tulos on saavutettavissa edes osittain muilla menetelmillä (laki koe-eläintoiminnasta 62/2006 3:7 §). Eettisen velvoitteen lisäksi opinnäytetyössä tutkimamme solumalli olisi huomattavan paljon halvempi, helpompi ja nopeampi tutkimusmenetelmä, kuin mitä hiirimallien valmistus olisi. Toivommekin, että olemme omalta opinnäytetyömme osalta voineet olla vähentämässä koe-eläinten käyttöä tutkimustyössä sekä kehittämässä tutkimusta vähemmän hiirimalleja hyödyntävään suuntaan.

Yksi tavoitteistamme oli toteuttaa opinnäytetyötä työelämälähtöisesti ja olla omalta osaltamme kehittämässä Oulun seudun ammattikorkeakoulun ja työelämän välistä yhteistyötä. Työelämälähtöisyys näkyy mielestämme opinnäytetyössämme selkeästi: aiheemme on toteutettu työn tilaajan toiveiden pohjalta ja tilaajan kanssa läheisessä yhteistyössä. Bioanalyytikon koulutuksella on työelämässä laajat toimintamahdollisuudet: bioanalytikko voi toimia klinisen laboratoriotyöskentelyn lisäksi myös erilaisissa projekteissa sekä tutkimustehtävissä. Toivommekin innostavamme tulevia

opinnäytetyön tekijöitä hakeutumaan sellaisiin opinnäytetyöprojekteihin, joissa aihe vastaisi opiskelijan kiinnostuksen kohteita sekä tukisi työelämää. (tavoite 3)

Otimme omiksi tavoitteiksemme syventävien opintojaksojen ja harjoitteluiden avulla saadun tietotaidon syventämiseen. Ilman bioanalytiikan koulutusohjelmassa toteutettuja molekyylibiologian ja geenitekniikan syventäviä opintojaksoja opinnäytetyön aihealue olisi todennäköisesti ollut hyvin vaikea sisäistää, sillä esimerkiksi genetiikan termistö on alalle hyvin spesifistä. Opintojaksoilla tutuiksi tulleet teoriat saivat opinnäytetyöprojektin myötä konkreettisen merkityksen todellisessa työelämässä. Näin ollen opinnäytetyön tekeminen syvensi asiantuntijuuttamme genetiikan tutkimustöissä ja menetelmissä hyvin paljon. (tavoite 4)

LÄHTEET

Behrens, J., Lowrick, O., Klein-Hitpass, L. & Birchmeier, W. 1991. The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24), 11495–11499.

Davies, J. A., Garrod, D. R. 1995. Induction of Early Stages of Kidney Tubule Differentiation by Lithium Ions. *Developmental biology* 167 (1), 50–60.

Heikkilä, M., 2002. Development of the Adreno-Genital System. Female sex determination, Ovarian and Adrenal Gland Ontogeny Regulated by Wnt-4 in Mice. Oulun yliopisto. Biocenter Oulu ja biokemian laitos. Väitöskirja.

Hendry, Caroline, Little, Melissa, 2011. Reprogramming the kidney: a novel approach for regeneration. *Kidney International*. Review -artikkeli.

Hennig, G., Lowrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. 1996. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *The Journal of biological chemistry* 271 (1), 595–602.

Herman, B., Centonze Frohlich, V., Lakowicz, J., Murphy, D., Spring, K., Davidson, M. 2012. Basic Concepts in Fluorescence. Review -artikkeli. Hakupäivä 1.10.2012
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>

Invitrogen, 2010. Käyttäjäopas, pcDNA 3.1+ ja pcDNA 3.1-. Hakupäivä 3.10.2012
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3_1_man.pdf

Jaypal, K., Wlaschin, K., Hu, W-S. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress (CEP)*, 103(10) 40–47.
Saatavilla pdf-muodossa:
http://hugroup.cems.umn.edu/HuGroup/PDFs/Jayapal_et_al_CHO_Review.pdf

Kuure, S., Popsueva, A., Jakobson, M., Sainio, K., Sariola, H. 2007. Glycogen Synthase Kinase-3 Inactivation and Stabilization of β -Catenin Induce Nephron Differentiation in Isolated Mouse and Rat Kidney Mesenchymes. Journal of the American Society of Nephrology. Hakupäivä 11.10.2012. <http://jasn.asnjournals.org/content/18/4/1130.full>

Laki koe-eläintoiminnasta. 20.1.2006/62.

Lodish, H., Berk A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A., Ploegh, H., 2008. Molecular Cell Biology, Yhdysvallat. W. H. Freeman.

Macherey-Nagel, 2012. Käyttäjäopas, Plasmid DNA Purification. Hakupäivä 17.6.2012
http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBoXtra.pdf

NanoDrop Technologies 2007. Käyttöopas, NanoDrop spektrofotometri. Hakupäivä 14.10.2012
http://batzerlab.lsu.edu/genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf

National Centre for Biotechnology Education (NCBE), 2000. Practical protocols – Illuminating DNA. University of Reading. Hakupäivä 4.10.2012
<http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/protocols/>

NCBI:n Probe -tietokanta, 2012. *In Situ* Hybridization (ISH). Hakupäivä 3.10.2012
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechISH.shtml>

Nobel-palkinnot, 2012. Hakupäivä 18.10.2012.
<http://www.nobelprize.org/>

Oulun seudun ammattikorkeakoulu, 2011. Tietoa OAMK:sta – Työelämälähtöistä koulutusta. Hakupäivä 25.9.2012
http://www.oamk.fi/tietoa_oamkista/koulutus/

Opetus- ja kulttuuriministeriö, 2012. Ammattikorkeakoulutus – AMK -uudistus 2011–2014. Hakupäivä 25.9.2012
http://www.minedu.fi/OPM/Koulutus/ammattikorkeakoulutus/ammattikorkeakoulu_uudistus/

Piston D., Patterson G., Claxton N. 2012. Nikon: Microscopy U. The source for microscopy education. Introduction to Fluorescent Proteins. Hakupäivä 3.10.2012.

<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html>

Rantala, I. & Lounatmaa, K. 1998. Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino.

Roche Diagnostics, 2011. Tuotetiedot, X-tremeGene 9 DNA Transfection reagent. Hakupäivä 4.10.2012 https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/06366511001_en_05.pdf

Ronkainen, V-P., Filosofian tohtori, Oulun yliopisto, Kehitysbiologian laitos. 2012. Haastattelu 14.3.2012 Biocenter Oulun tiloissa. Tekijöiden hallussa.

Ryhänen, S. 2006. Biophysical Studies on Cationic Liposomes – Implications for Self-Assembly and Mechanism of Lipofection. Helsingin yliopisto. Väitöskirja. Hakupäivä 23.8.2012

http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/ryhanen/biophys_i.pdf

Tiivistelmä suomeksi:

<http://savotta.helsinki.fi/halvi/tiedotus/vaitokset.nsf/b688d98986c9e9edc2256a4c003e4ba9/f7b8024deba956e3c22570d8003e3494?OpenDocument>

Schmidt, F., Setzer D. 2006. RNA: Transcription and RNA processing. Teoksessa T. Delvin (toim.) Textbook of Biochemistry with clinical correlations. Yhdysvallat. Wiley-Liss. 175–176.

Shan, J., Jokela, T., Skovorodkin, I. & Vainio, S. 2010. Mapping of the fate of cell lineages generated from cells that express the Wnt4 gene by time-lapse during kidney development. *Differentiation* 79 (1), 57–64.

Shan, J., professori, Oulun yliopisto, Kehitysbiologian laitos, Biocenter Oulu. 2012. Sähköpostihaastattelu 19.9.2012. Tekijöiden hallussa.

Sigma-Aldrich 2012. Käyttöturvallisuustiedote ja tuoteinformaatio, BIO. Hakupäivä 1.10.2012

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b1686?lang=fi®ion=FI>

Solunetti 2006a. Valomikroskopia – Fluoresenssimikroskopia ja immunofluoresenssi. Hakupäivä 1.10.2012

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fluoresenssimikroskopia/>

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunofluoresenssi/>

Solunetti, 2006b. Molekyylibiologisia menetelmiä – Kloonaus. Hakupäivä 3.10.2012

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/vektorit/2/>

Solunetti, 2006c. Fosfolipidit. Hakupäivä 18.10.2012.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fosfolipidit/2/>

Stark, K., Vainio, S., 1994. Epithelial Transformation of Metanephric Mesenchyme in the Developing Kidney Regulated by Wnt-4. *Nature* 372, 679–686.

Thermo Scientific, 2012a. Overview of Immunohistochemistry. Hakupäivä 21.8.2012

<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F95B91A9-3DC1-4B56-8E8D-59CA044A8BA7>

Uniprot -tietokanta, 2012. GSK3A ja B, ihmisellä. Hakupäivä 1.10.2012

<http://www.uniprot.org/uniprot/P49840>

<http://www.uniprot.org/uniprot/P49841>

Valerius, M. T., Patterson, L. T., Witte, D. P. & Potter, S. S. 2002. Microarray analysis of novel cell lines representing two stages of metanephric mesenchyme differentiation. *Mechanisms of development* 110, 151–164.

Weeks, D., Donelson J., 2006. RNA: Regulation of gene expression. Teoksessa T. Delvin (toim.)

Textbook of Biochemistry with clinical correlations. United States of America. Wiley-Liss. 307–308

1. Siirsimme koko tilavuuden eli 100 ml:aa yön yli kasvatettuja *E.coli*-soluja kahteen 50 ml falconputkiin.
2. Sentrifugoimme soluja 3500 rpm:n nopeudella 40 minuutin ajan huoneenlämmössä (RT) jonka jälkeen poistimme supernatantin kaatamalla. Sentrifugoinnin jälkeen laitoimme myöhemmin tarvittavan ELU-puskurin lämpenemään +65 °C:een vesihauteeseen.
3. Suspensoimme putkien pohjalle jääneet solut 12 ml:aan RES-puskuria. RES-puskuri sisältää RNAaseja, joiden aktiivisena pitämiseksi pipetoimme puskurin +4 °C:een lämpöisenä (jäykaappikylmänä).
4. Lisäsimme bakteeri+RES -liuokseen LYS-puskuria solujen hajotusta varten ja annoimme puskurin vaikuttaa noin 5 minuutin ajan huoneenlämmössä.
5. LYS-puskurin vaikuttaessa asetimme Column-erottelupylväät telineeseen ja erottelupylväiden sisään kuivat Filter-suodattimet. Alle laitoimme astian läpi valuvaa nestettä varten.
6. Pipetoimme 15 ml:aa EQU-puskuria suodattimen reunoja pitkin kiertävällä liikkeellä, jotta kuivat suodattimet kostuisivat ja läpäisisivät nestettä tasaisesti.
7. Lisäsimme bakteeri+LYS -puskuriseokseen 12 ml:aa NEU-puskuria, jossa on mm. kaliumasetaattia. Liuos sekoitettiin kääntelemällä putkea muutaman kerran ylösalaisin.
8. Aloitimme plasmidien puhdistamisen kaatamalla falcon-putkien sisällön suoraan suodattimen sisältävään pylvääseen, mahdollisimman keskelle suodatinta (reunoja välttäen).
9. Pipetoimme jälleen 15 ml:aa EQU-puskuria suodattimen reunoille kiertävällä liikkeellä. Pylvästä tippuvaa nestettä ei tässä vaiheessa kerätty talteen.
10. Kun kaikki neste oli valunut pylvästä, otimme varovasti ja reunoja koskettamatta suodattimen pois pylvästä ja heitimme suodattimet roskiin, sillä niitä ei enää tarvittu eristyksessä.
11. Pesimme plasmidi-DNA:n sisältävää pylvästä pipetoiden noin 8 ml:aa WASH-puskuria pylvään sisään. Toistimme pesun useita kertoja niin, että käytimme yhteensä 25 ml:aa WASH-puskuria jokaiseen näytteeseen.

12. Vaihdoin tässä vaiheessa nesteenkeruualustan tilalle puhtaat falcon-putket. Lisäsimme 15 ml:aa esilämmitettyä ELU-puskuria pylväisiin. Plasmidi-DNA siirtyi eluoinnilla pylvästä falcon-putkeen.
13. Lisäsimme falcon-putkiin 10 ml:aa isopropanolia ja sentrifugoimme putkia noin 4000 rpm:n kierrosnopeudella 40 minuuttia +4 °C:een asetetulla kylmäseentrifugilla.
14. Sentrifugoinnin jälkeen kaadoimme isopropanoli-supernatantin pois ja lisäsimme pohjalle jääneen napin päälle 5 ml:aa 70 %:sta etanolia. Sentrifugoimme etanoli-DNA -seosta 4000 rpm:n kierrosnopeudella 15 minuuttia huoneenlämmössä
15. Sentrifugoinnin päätyttyä poistimme etanolin putkista mahdollisimman hyvin, jotta etanoli haihtuisi näytteistä eli näytteet kuivuisivat nopeasti. Jäljelle jääneen etanolin annoimme haihtua sakan päältä huoneenlämpöisessä vetokaapissa. Näytteiden kuivumiseen meni noin 30 minuuttia.
16. Kuivuneen sakan suspensoimme 200 µl:aan TE-puskuria ja siirsimme näytteet 1,5 ml:n korkoihin eppendorf-putkiin.
17. Testasimme eristyksen jälkeen näytteiden konsentraatiot absorbanssin mittauksella. Mittauksen jälkeen veimme näytteet -21 °C:een pakastimeen säilyttämistä varten

NÄYTTEIDEN LAIMENTAMINEN ABSORBANSSIEN PERUSTEELLA

LIITE 2

Rochen (2011, hakupäivä 4.10.2012) ilmoittama optimikonsentraatio transfektioreaktiossa käytettävälle DNA-näytteelle oli 100 ng/μl. Näytteet laimennettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti TE-puskuriin. Näytteeseen lisättävän TE-puskurin tilavuuden saimme laskettua laimennuskaavalla (1)

$$c1 \cdot V1 = c2 \cdot V2$$

$$V1 = \frac{c2 \cdot V2}{c1} \quad (1),$$

missä $c1$ on näytteen alkuperäinen konsentraatio
 $c2$ on laimennoksen haluttu konsentraatio (jokaiselle näytteelle 100 ng/μl)
 $V1$ on näytteen tilavuus
 $V2$ on laimennoksen lopputilavuus

Valmiit laskut on esitetty alla olevassa taulukossa.

TAULUKKO. Plasmidi-DNA -näytteiden laimentaminen.

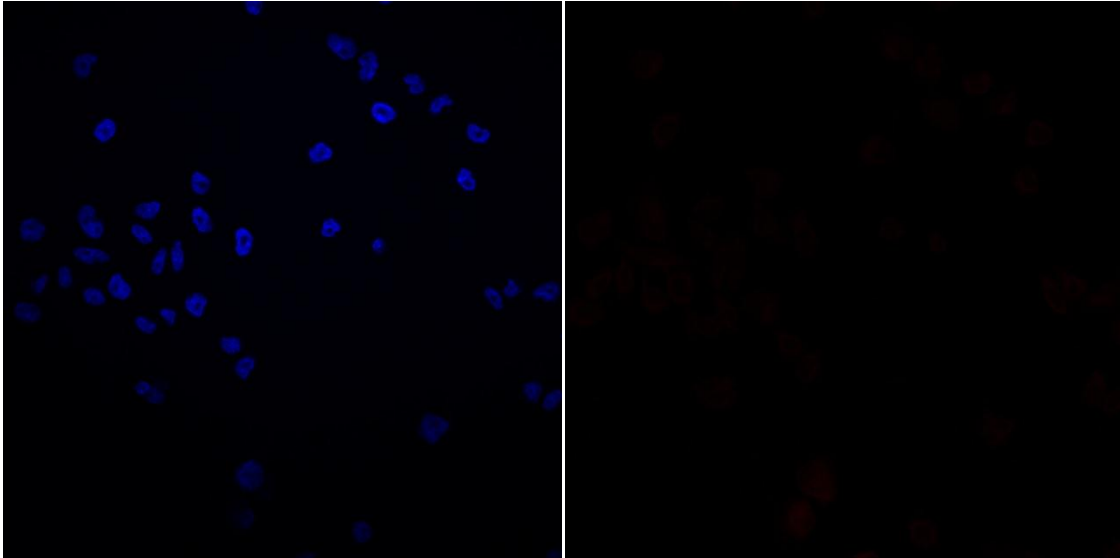
Näyte	Alkuperäinen konsentraatio (c1)	Laimennoksen lopputilavuus (v2)	Sijoitus yhtälöön $V1 = \frac{c2 \cdot V2}{c1}$	Pipetoitavan näytteen tilavuus (v1)	Pipetoitavan puskurin tilavuus (v2-v1)
CMV	1931,1 ng/μl	200 μl	$V1 = \frac{100 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 200 \mu\text{l}}{1931,1 \text{ ng}/\mu\text{l}}$ $V1 = 10,36$	≈ 10 μl	190 μl
pEcadS	2985,8 ng/μl	300 μl	$V1 = \frac{100 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 300 \mu\text{l}}{2985,8 \text{ ng}/\mu\text{l}}$ $V1 = 10,05$	≈ 10 μl	290 μl
pESen	2954,3 ng/μl	300 μl	$V1 = \frac{100 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 300 \mu\text{l}}{2954,3 \text{ ng}/\mu\text{l}}$ $V1 = 10,15$	≈ 10 μl	290 μl
pEcadL	2580,7 ng/μl	260 μl	$V1 = \frac{100 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 260 \mu\text{l}}{2580,7 \text{ ng}/\mu\text{l}}$ $V1 = 10,07$	≈ 10 μl	250 μl
pELen	1110,5 ng/μl	220 μl	$V1 = \frac{100 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 220 \mu\text{l}}{1110,5 \text{ ng}/\mu\text{l}}$ $V1 = 19,81$	≈ 20 μl	200 μl

1. Pesimme solut pipetoimalla mediumin pois solujen kasvatuskuoppalevyiltä ja lisäsimme tilalle 1 ml:n PBS:ää. Jotta kaikki medium olisi varmasti poistunut kuopasta, pipetoimme myös PBS:n pois ja lisäsimme tilalle 1 ml:n puhdasta PBS:ää.
2. Solujen kiinnitystä varten pipetoimme PBS:n pois ja lisäsimme 1 ml:n 4 %:sta PFA:ta. Annoimme solujen kiinnittyä vetokaapissa huoneenlämmössä 30 minuuttia. Paraformaldehydi on mm. potentiaalinen karsinogeeni. Tämän vuoksi sitä tulee ehdottomasti käsitellä asianmukaisin turvatoimin.
3. Kiinnityksen jälkeen pesimme paraformaldehydin pois lasien päältä pipetoimalla 3 kertaa PBS:ää kuoppalevyihin. Jokaisella kerralla annoimme lasien peseytyä 10 minuuttia.
4. Epäspesifisen vasta-aineen sitoutumisen estämiseksi inkuboimme näytteitä 2 %:lla FBS/PBS -liuoksessa noin tunnin ajan huoneenlämmössä. Pipetoimme 50 µl:n pisaroita FBS/PBS -liuosta parafilmillä päällystetylle lasilevyille ja nostimme peitinlasit kuoppalevystä pisaraan solupuoli alaspäin.
5. Seuraavaksi värjäsimme näytteet primaarilla vasta-aineella. Pipetoimme uudelle parafilmipäällysteiselle lasilevyille 24,5 µl:aa FBS/PBS -liuokseen 1:500 -suhteessa liotettua anti-E-kadheriini-vasta-ainetta. Siirsimme peitinlasit ensimmäiseltä lasilta suoraan pisaroiden päälle solupuoli nestettä vasten. Jokaisessa solulinjassa yksi peitinlasi oli sekundaarisen vasta-aineen negatiivinen kontrolli, eikä näitä laseja siirretty primaarivasta-aineen päälle lainkaan. Annoimme vasta-aineen sitoutua näytteisiin yön yli +4 °C:een lämpötilassa valolta suojattuna.
6. Aamulla pesimme ensimmäisen vasta-aineen pois näytteiden päältä. Siirsimme varovasti solut lasin päältä kuoppalevyille niin, että ne olivat kuopassa solupuoli ylöspäin. Pipetoimme kuopille 3 kertaa 1 ml:n PBS:ää ja annoimme solujen peseytyä noin 5 minuuttia jokaisessa vaiheessa.
7. Värjäsimme näytteet sekundaarivasta-aineella. Tätä vasta-ainetta pipetoimme uudelle parafilmilasille noin 30 µl:n pisaroissa. Siirsimme solut huolellisesti kuoppalevyiltä pisaran päälle, solupuoli alaspäin. Vasta-aine sai sitoutua noin 2 tuntia huoneenlämmössä valolta suojattu-

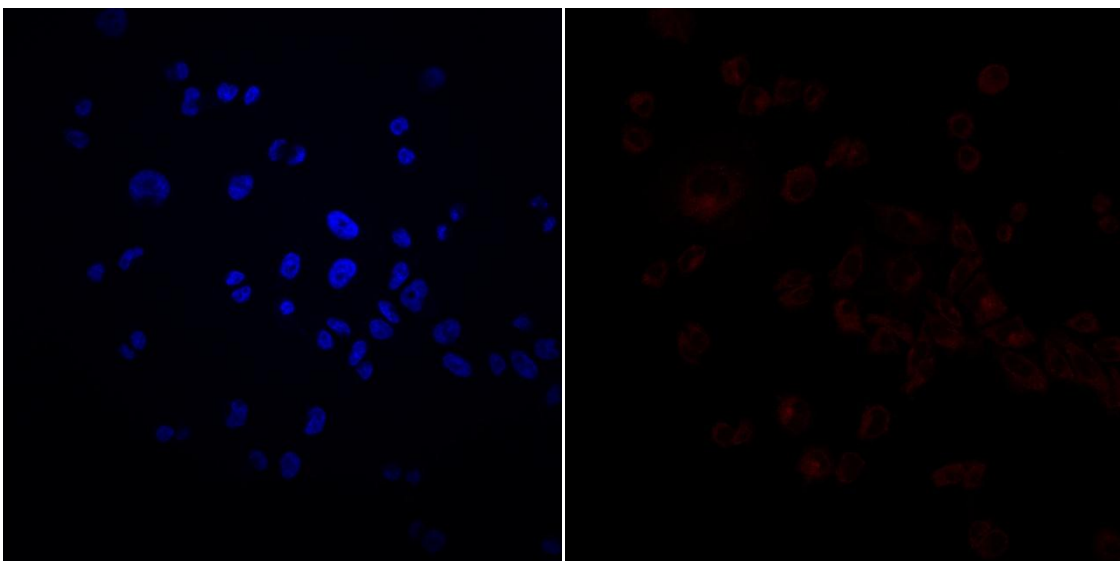
na. Pisaroittain lisättyä vasta-ainetta ei tarvitse olla määrällisesti paljon, että se levittyy taiseisesti koko lasin pinnalle ja on kontaktissa solujen kanssa.

8. Sekundaarivasta-aineen vaikuttamisen jälkeen pesimme soluja kuoppalevyllä, 1 ml:ssa PBS:ää solupuoli ylöspäin. Toistimme pesun kolme kertaa noin 10 minuutin välein.
9. Värjäsimme solujen tumat Hoechst-värillä. Lisäsimme kuoppalevyihin 1 µg/ml-vahvuista Hoechst-väriä 1 ml:aan PBS:ää ja annoimme vaikuttaa noin 3 minuutin ajan. Hoechst-väri on mutageenistä, jonka vuoksi syntyvä jäte kerättiin omaan astiaansa ja pipetoidessa noudatettiin varovaisuutta.
10. Pesimme solut jälleen 1 ml:lla PBS:ää. Annoimme solujen peseytymään noin 10 minuuttia pesujen välillä ja vaihdoimme liuoksen 3 kertaa.
11. Huuhdelimme PBS:n pois kuopista pipetoimalla ja lisäämällä tilalle tislattua vettä.
12. Nimesimme objektilasit ja liimasimme näytteet lasille Thermo Scientificin Ultra Mount -kiinnitysaineella. Tiputimme liimaa kaksi pientä pisaraa objektilaseille, toisen näytettä, toisen kontrollinäytettä varten. Poistimme ylimääräisen veden lasista koskettamalla pinsettien avulla kuopasta nostetun lasin reunaa sellupaperiin ja siirsimme lasit pisaroiden päälle, solupuoli liimapisaraa vasten.

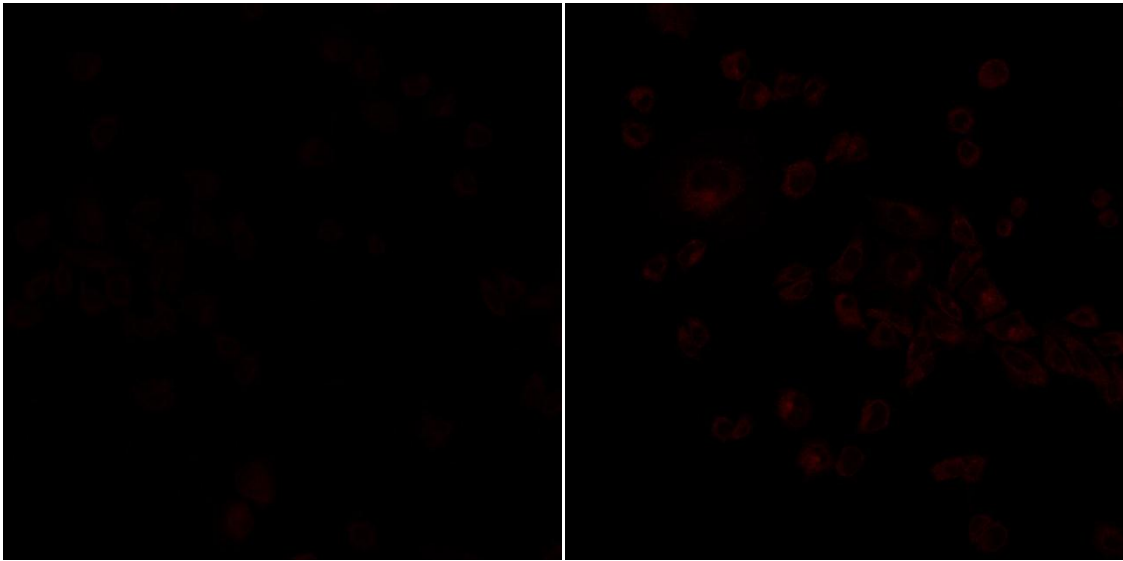
CHO-solulinja



KUVIO 8. CHO-solujen vasta-ainevärjäyksen kontrolli. Vasta-ainevärjäys on tehty ilman primaaria vasta-ainetta sekundaarisen vasta-aineen mahdollisesti epäspesifin sitoutumisen havainnollistamiseksi. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä, ja mahdollinen epäspesifinen värjäytyminen näkyisi oikeassa ruudussa punaisena.

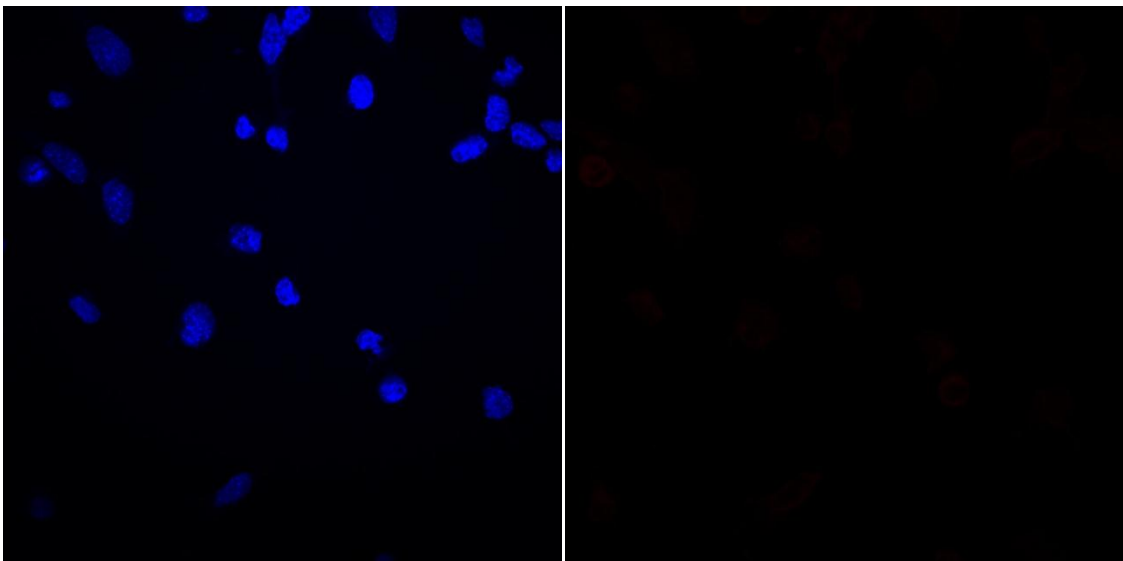


KUVIO 9. CHO-solujen vasta-ainevärjäys. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä ja vasta-ainevärjäyksen signaali oikeassa ruudussa punaisella.

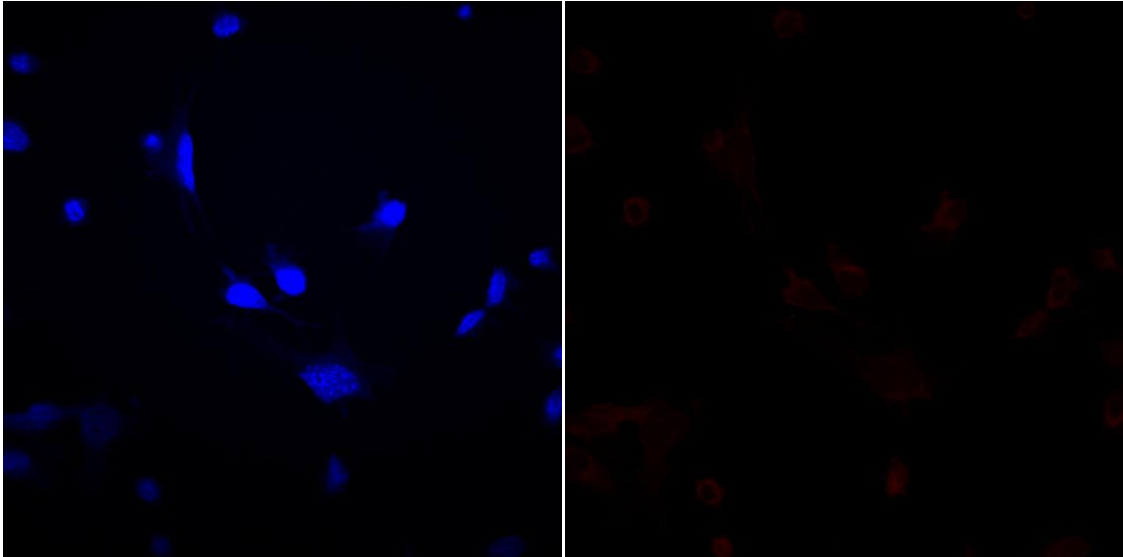


KUVIO 10. CHO-solujen E-kadheriinin vasta-ainevärjäyksen kontrolli (vas.) ja vasta-ainevärjäys (oik.) rinnakkain.

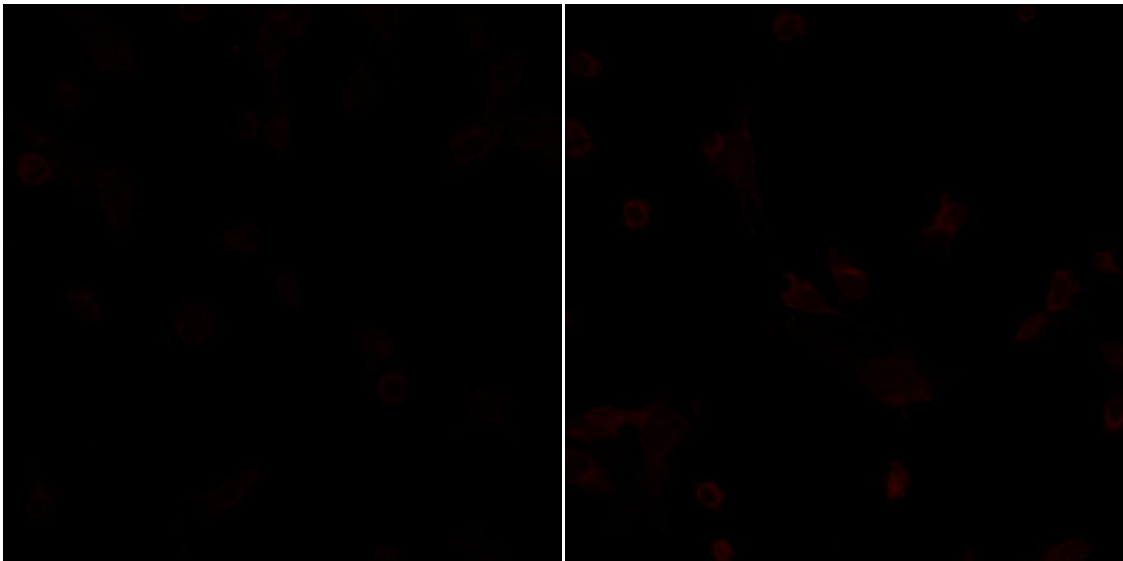
MK3-solulinja



KUVIO 11. MK3-solujen vasta-ainevärjäyksen kontrolli. Värjäys on tehty ilman primaarivasta-ainetta sekundaarisen vasta-aineen mahdollisesti epäspesifin sitoutumisen havainnollistamiseksi. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä, ja mahdollinen vasta-aine näkyisi oikeassa ruudussa punaisena.

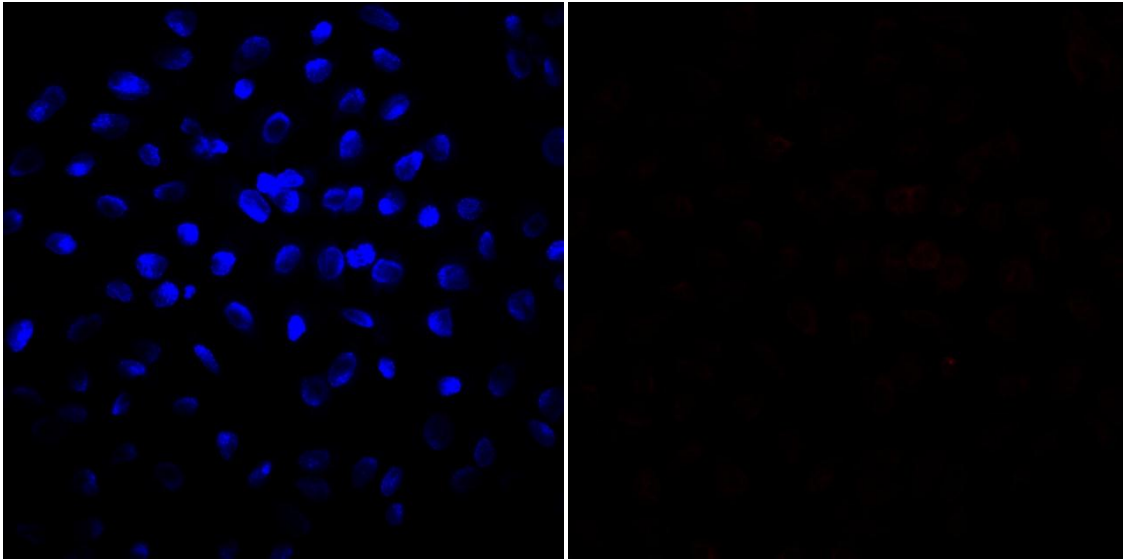


KUVIO 12. MK3-solujen vasta-ainevärijäys. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä ja vasta-ainevärijäyksen signaali oikeassa ruudussa punaisella.

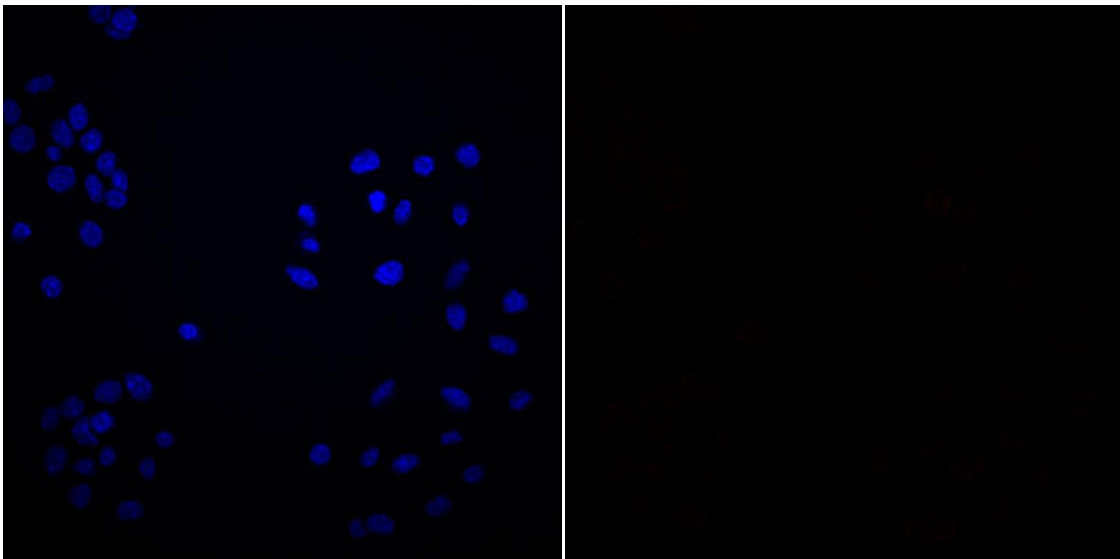


KUVIO 13. MK3-solujen vasta-ainevärijäyksen kontrolli (vas.) ja E-kadheriinin vasta-ainevärijäys (oik.) rinnakkain.

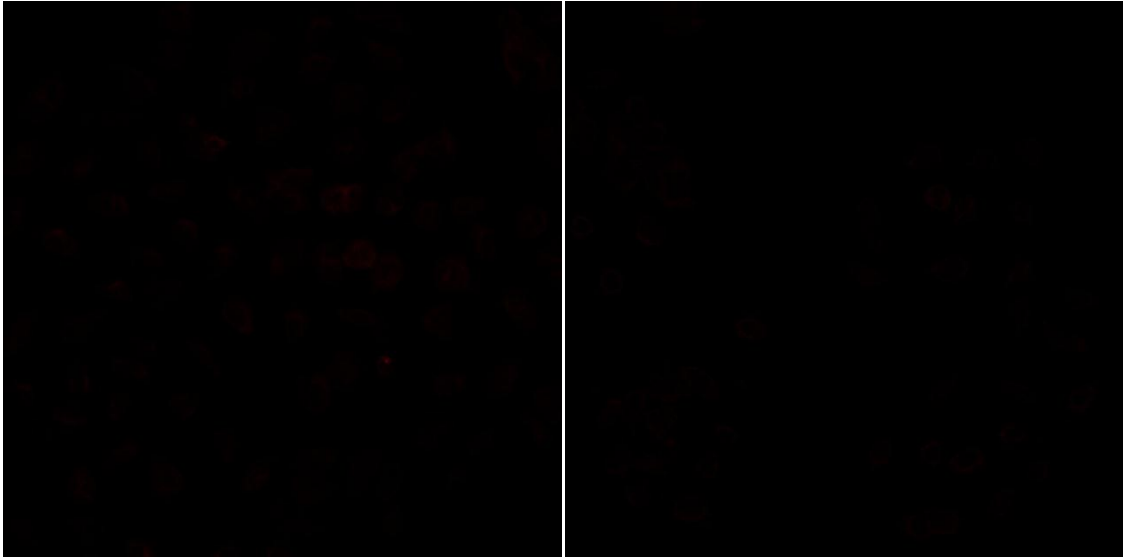
MK4-solulinja



KUVIO 14. MK4-solujen vasta-ainevärjäyksen kontrolli. Vasta-ainevärjäys on tehty ilman primääria vasta-ainetta sekundaarisen vasta-aineen mahdollisesti epäspesifin sitoutumisen havainnollistamiseksi. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä, ja mahdollinen ei spesifinen värjäytyminen näkyisi oikeassa ruudussa punaisena.

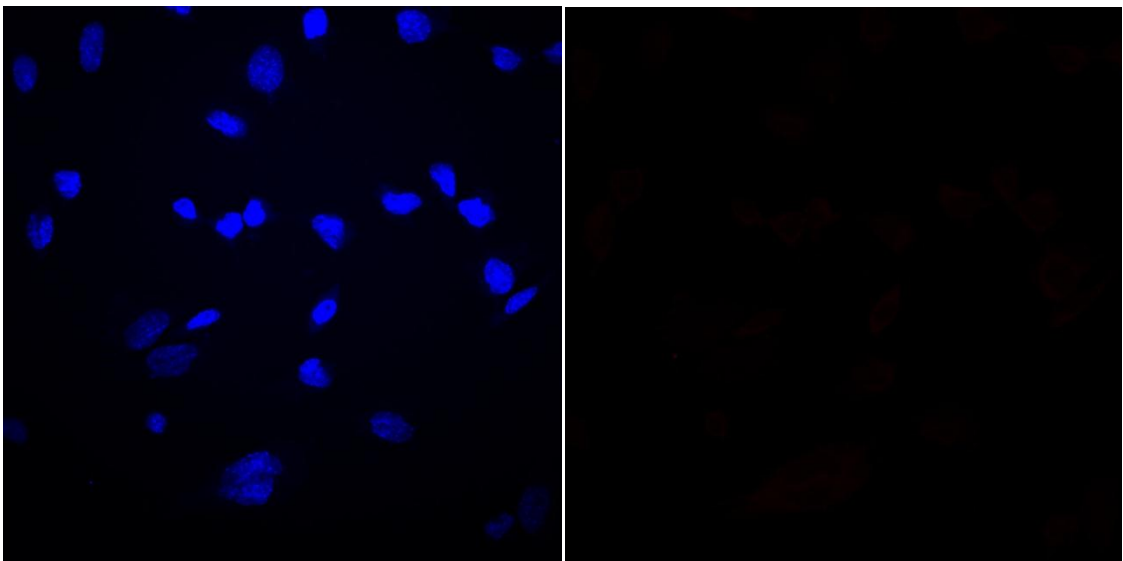


KUVIO 15. MK4-solujen vasta-ainevärjäys. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä, mutta E-kadheriinin signaalia ei näy (oik.).

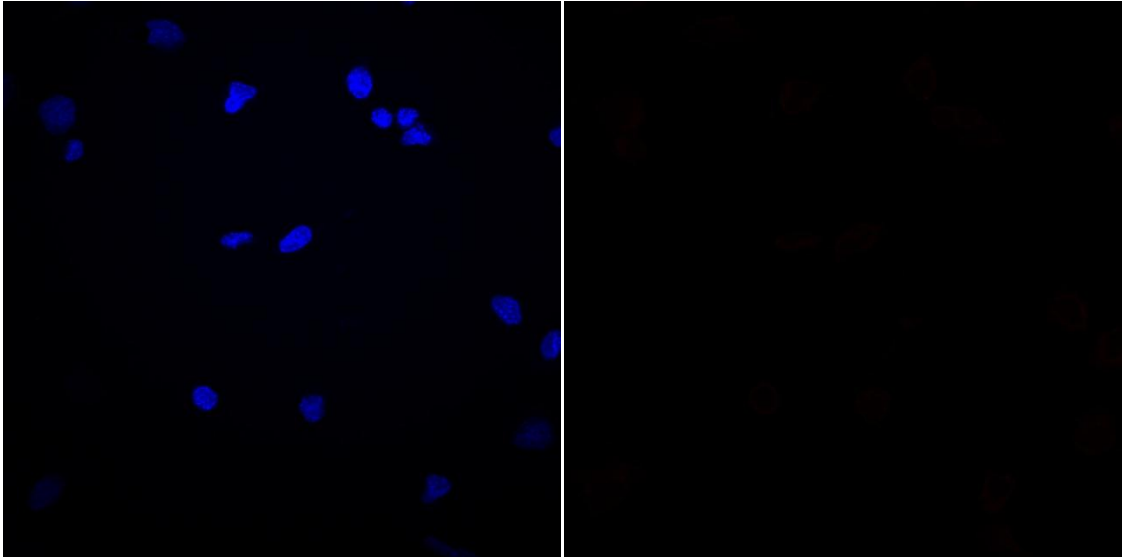


KUVIO 16. MK4-solujen vasta-ainevärjäyksen kontrolli (vas.) ja E-kadheriinin vasta-ainevärjäys (oik.) rinnakkain. Kummassakaan ruudussa ei näy signaalia.

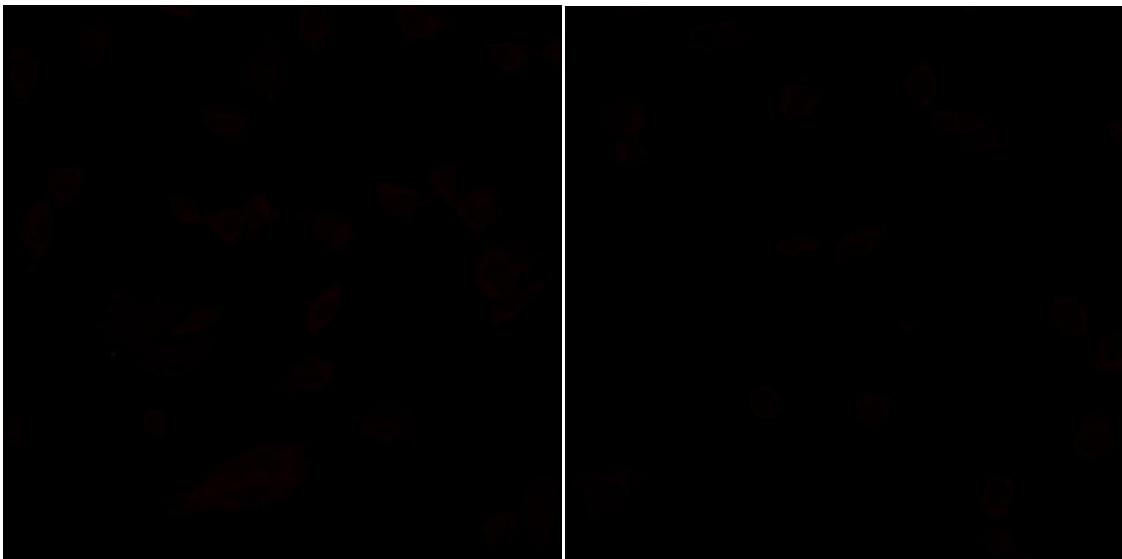
W4MC-solulinja



KUVIO 17. W4MC-solujen vasta-ainevärjäyksen kontrolli. Vasta-ainevärjäys on tehty ilman primääria vasta-ainetta sekundaarisen vasta-aineen mahdollisesti epäspesifin sitoutumisen havainnollistamiseksi. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä, ja mahdollinen epäspesifinen vasta-ainevärjäytyminen näkyisi oikeassa ruudussa punaisena.

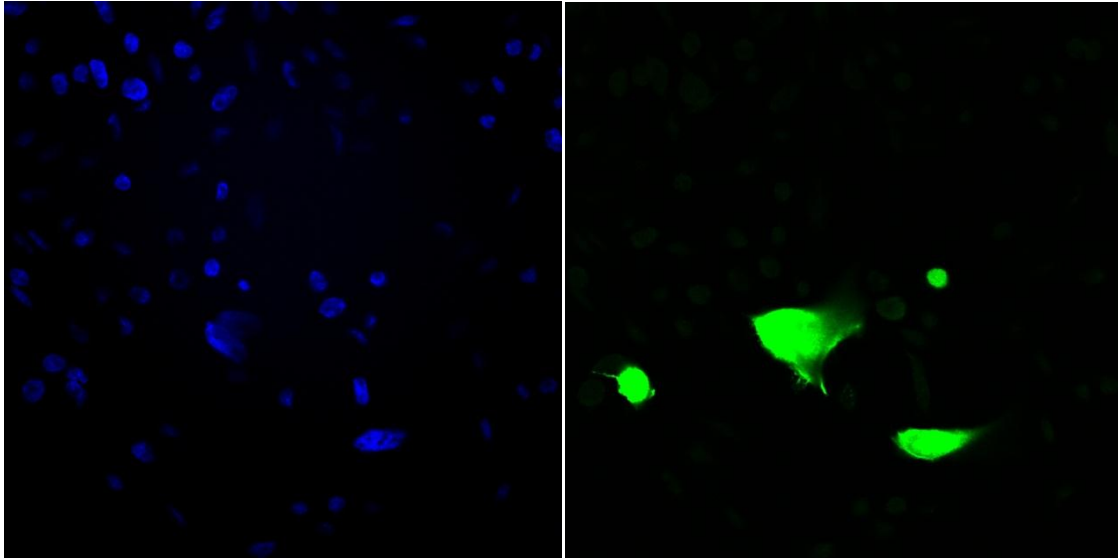


KUVIO 18. W4MC-solujen vasta-ainevärjäys. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä ja vasta-ainevärjäyksen signaali tulisi näkyä oikeassa ruudussa punaisella.

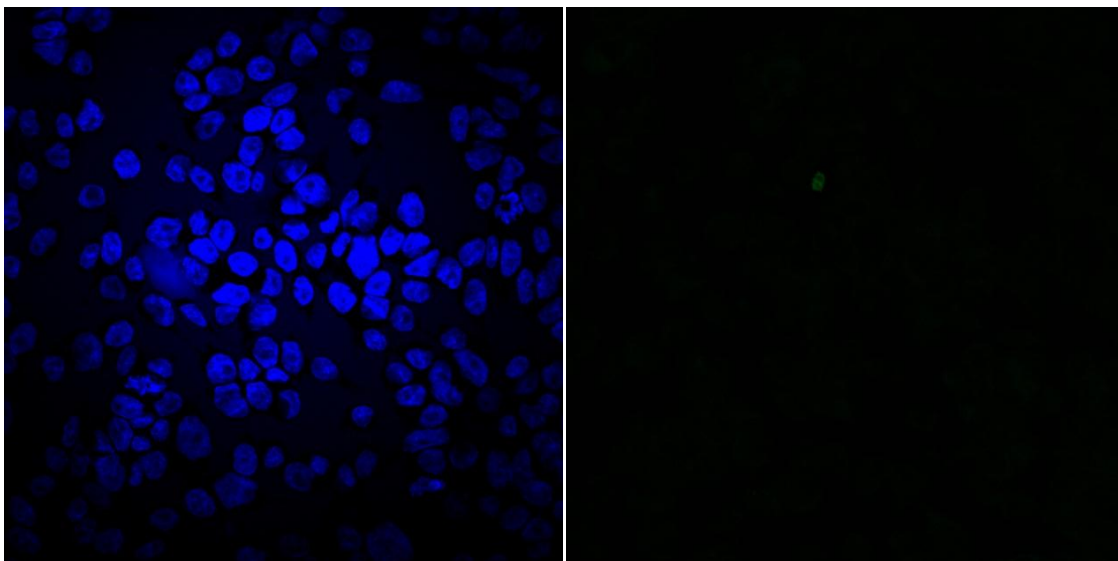


KUVIO 19. W4MC-solujen vasta-ainevärjäyksen kontrolli (vas.) ja E-kadheriinin vasta-ainevärjäys (oik.) rinnakkain.

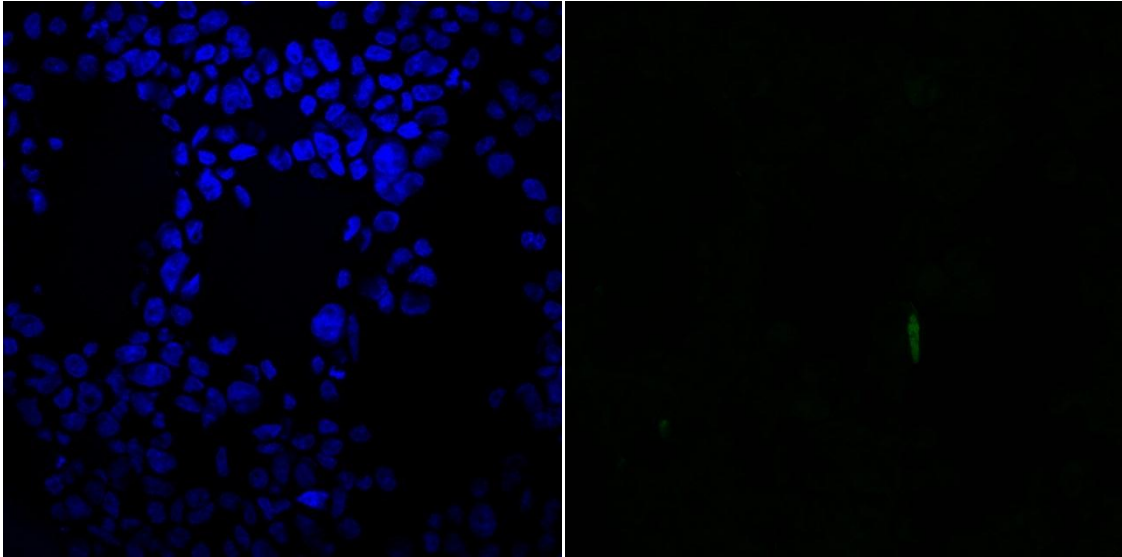
CHO-solut



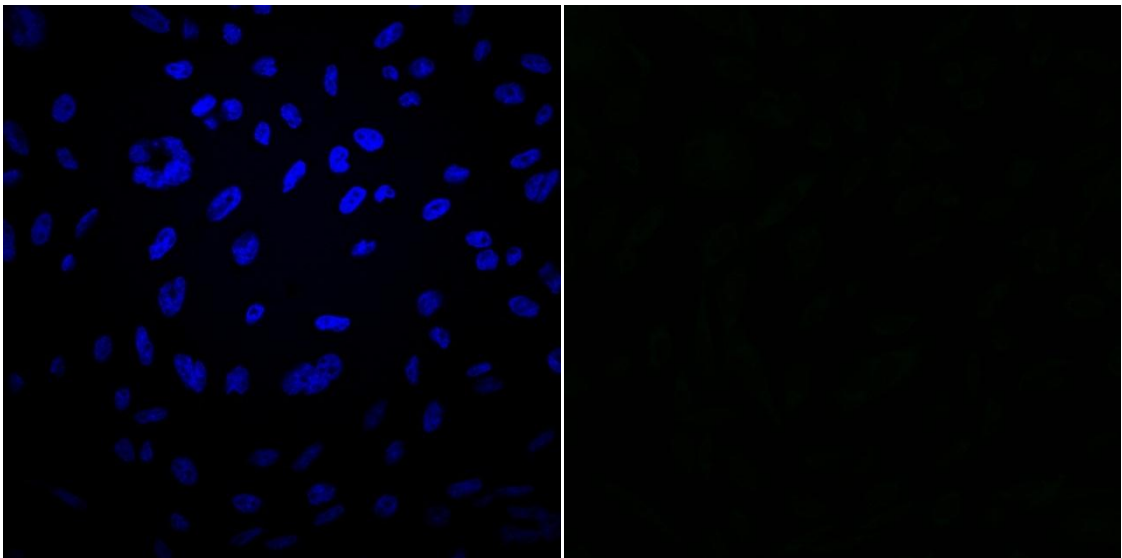
KUVIO 20. CHO-solujen transfektiokontrollit. Oikealla vihreänä fluoresoiviin soluihin on transfektoitu sytomegaloviruksen promoottorilla varustettu YFP. Tällä voitiin tarkkailla transfektion onnistumista.



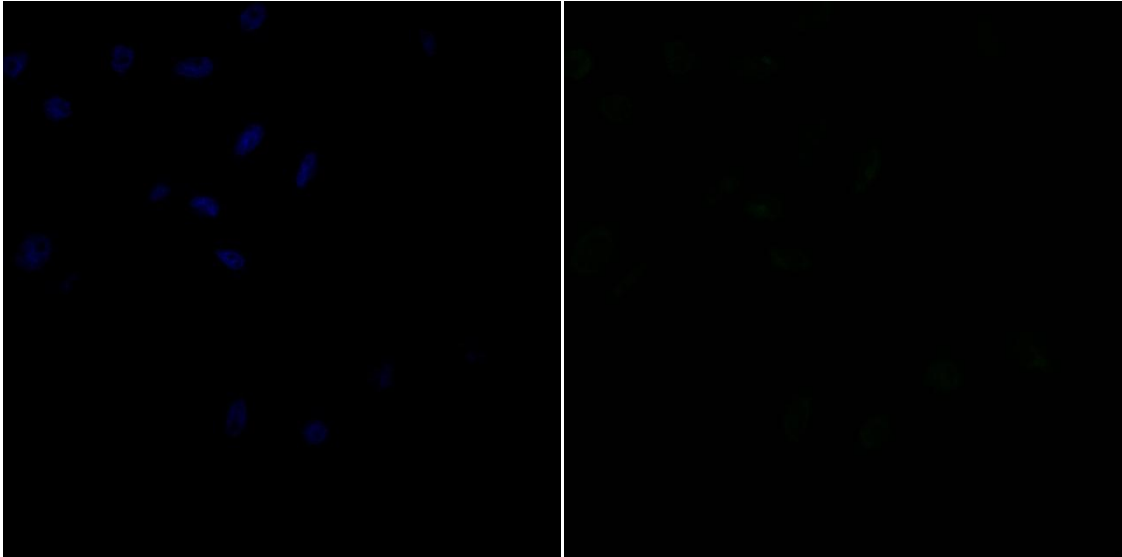
KUVIO 21. CHO-solut, joihin on transfektoitu pitkällä promoottorilla varustettu E-kadheriin reporteri (CHOEcadL)



KUVIO 22. CHO-solut, joihin on transfektoitu pitkällä promoottorilla sekä tehostajaksolla varustettu reportteri (CHOEcadLen)

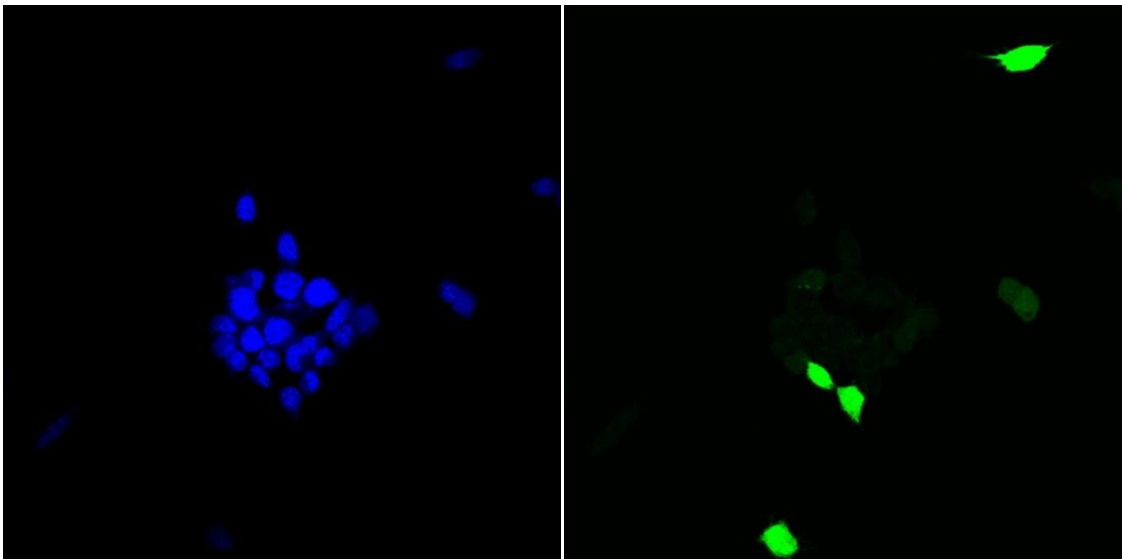


KUVIO 23. CHO-solut, joissa oli lyhyt promoottori (CHOEcadS), eivät tuottaneet fluoresoivaa signaalia.

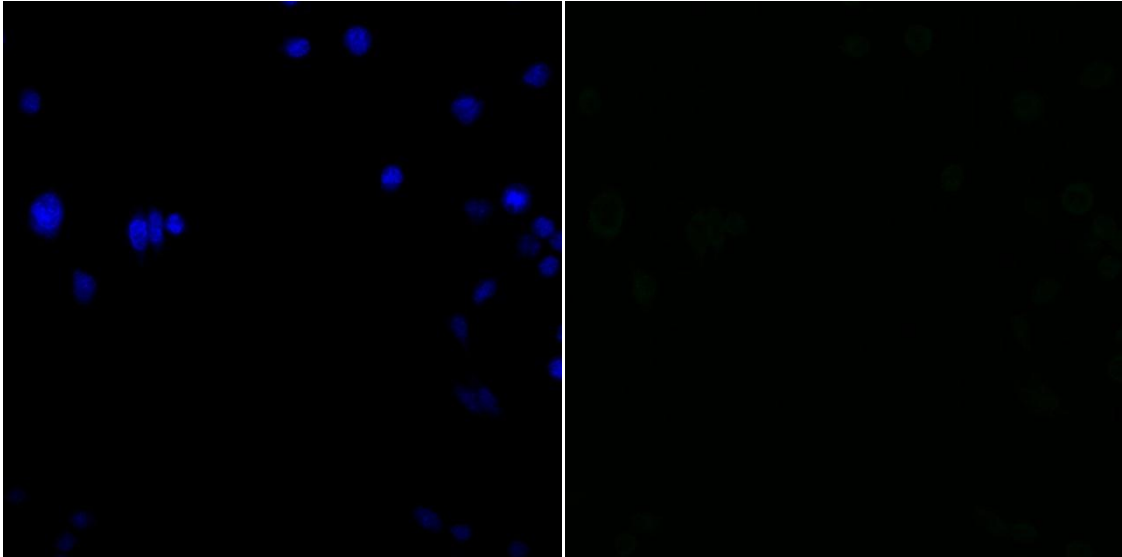


KUVIO 24. CHO-solut, joissa oli lyhyt promoottori ja tehostajajakso (CHOEcadSen), eivät tuottaneet fluoresoivaa signaalia.

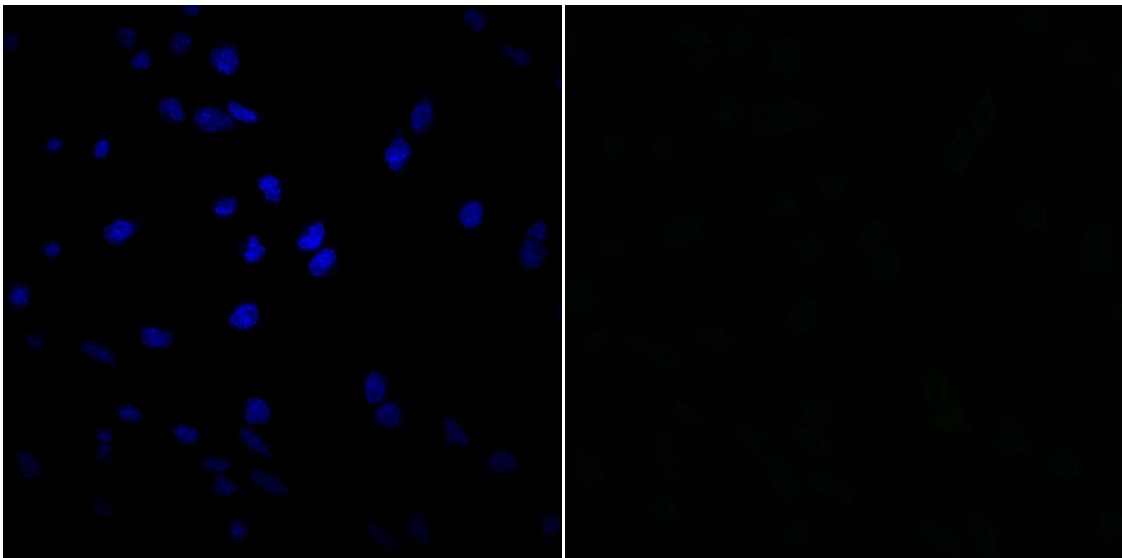
MK3-solut



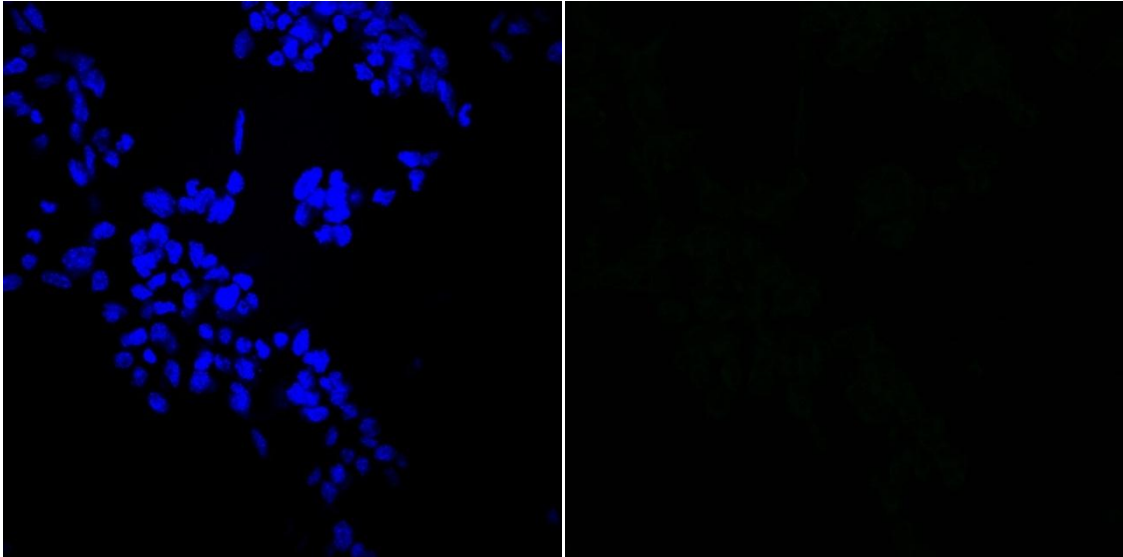
KUVIO 25. MK3-solujen transfektiokontrollit. Oikealla vihreänä fluoresoiviin soluihin on transfektoitu sytomegaloviruksen promoottorilla varustettu YFP. Tällä voitiin tarkkailla transfektion onnistumista.



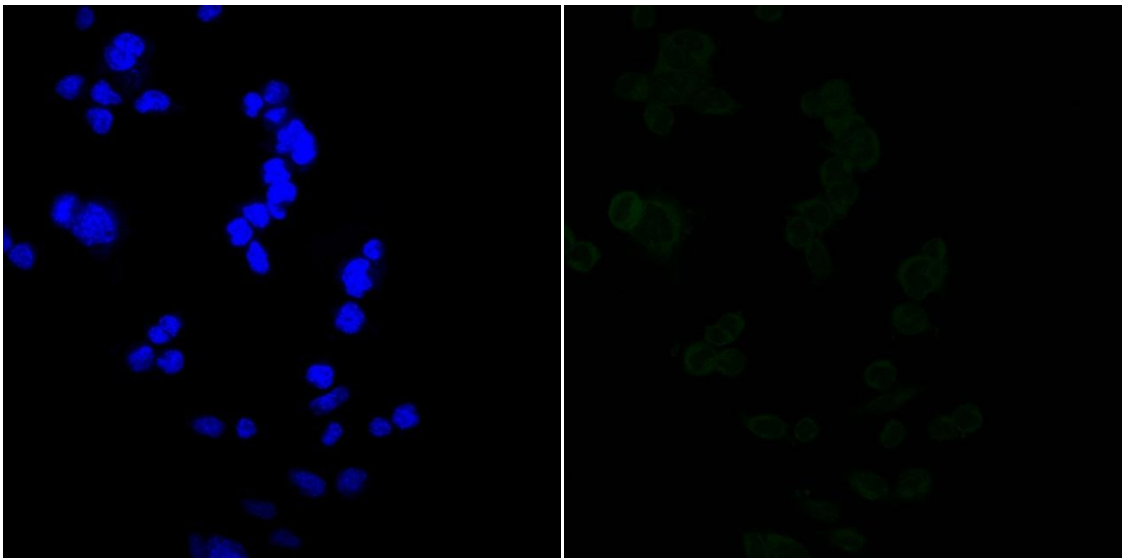
KUVIO 26. MK3-solut, joiden E-kadheriinin reporterissa oli pitkä promoottori (MK3EcadL)



KUVIO 27. MK3-solut, joiden reporterissa oli pitkä promoottori sekä tehostajajakso (MK3EcadLen)

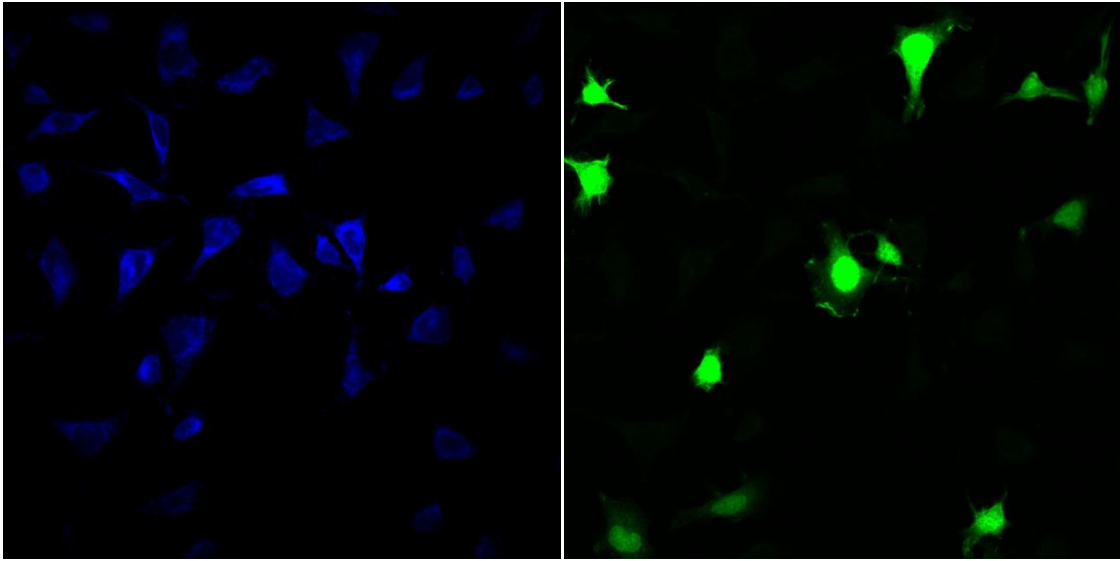


KUVIO 28. MK3-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli lyhyt promoottori (MK3EcadS)

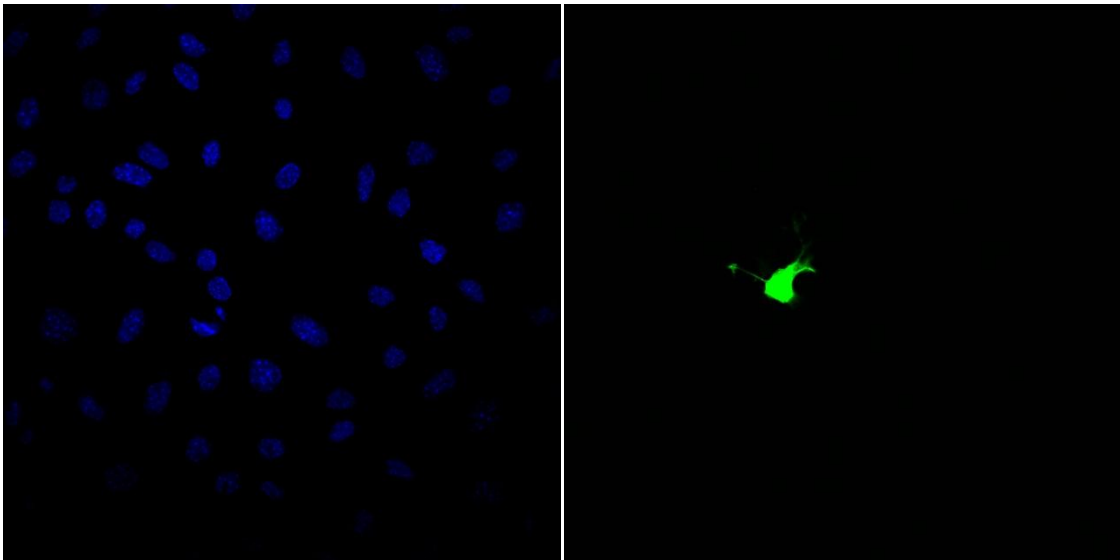


KUVIO 29. MK3-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli lyhyt promoottori ja tehostajajakso (MK3EcadSen)

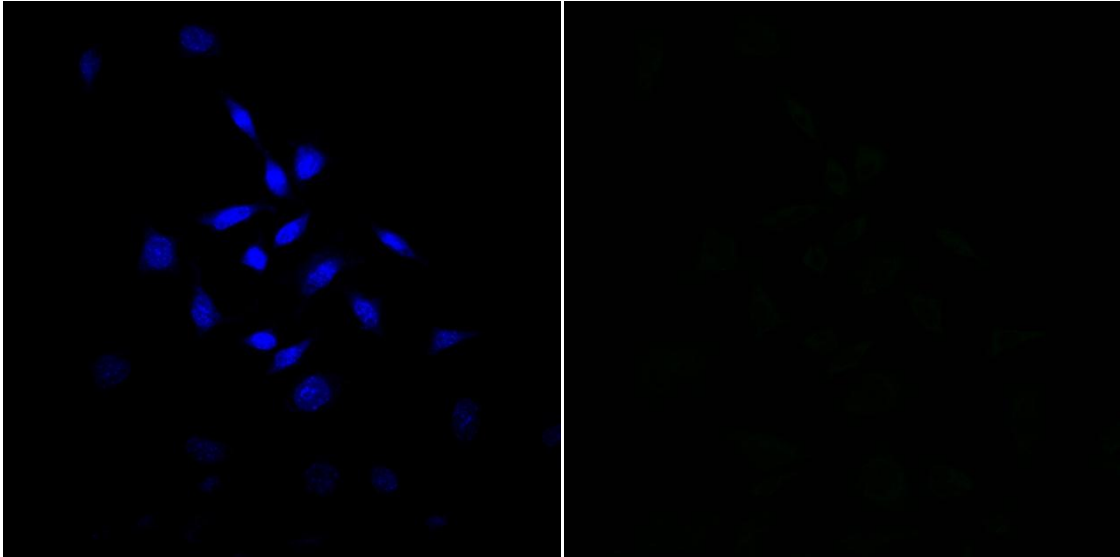
MK4-solut



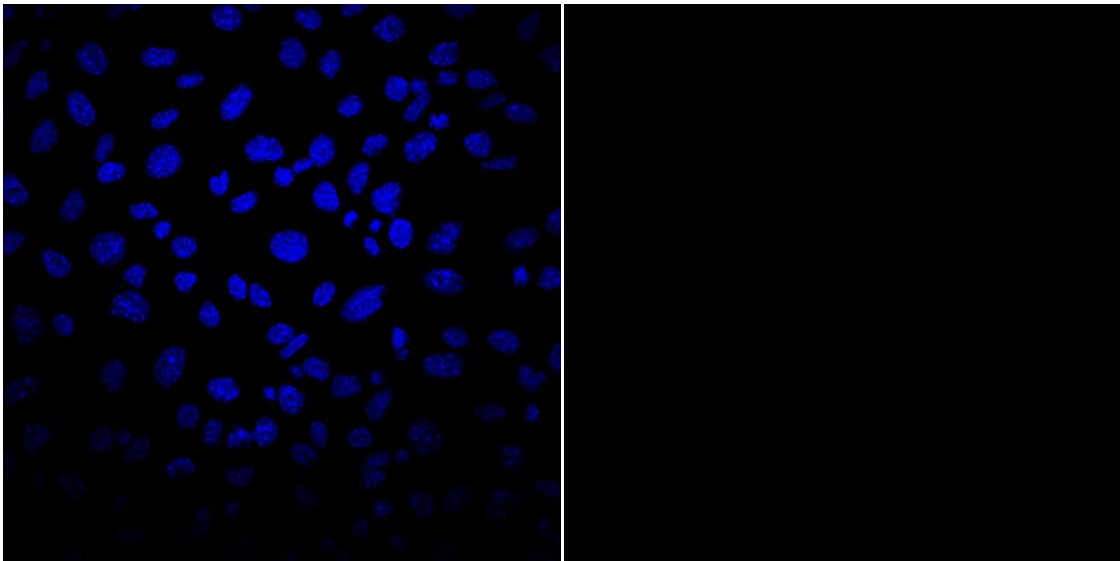
KUVIO 30. MK4-solujen transfektion kontrolli. Oikealla vihreänä fluoresoiviin soluihin on transfektoitu sytomegaloviruksen promoottorilla varustettu YFP. Tällä voitiin tarkkailla transfektion onnistumista.



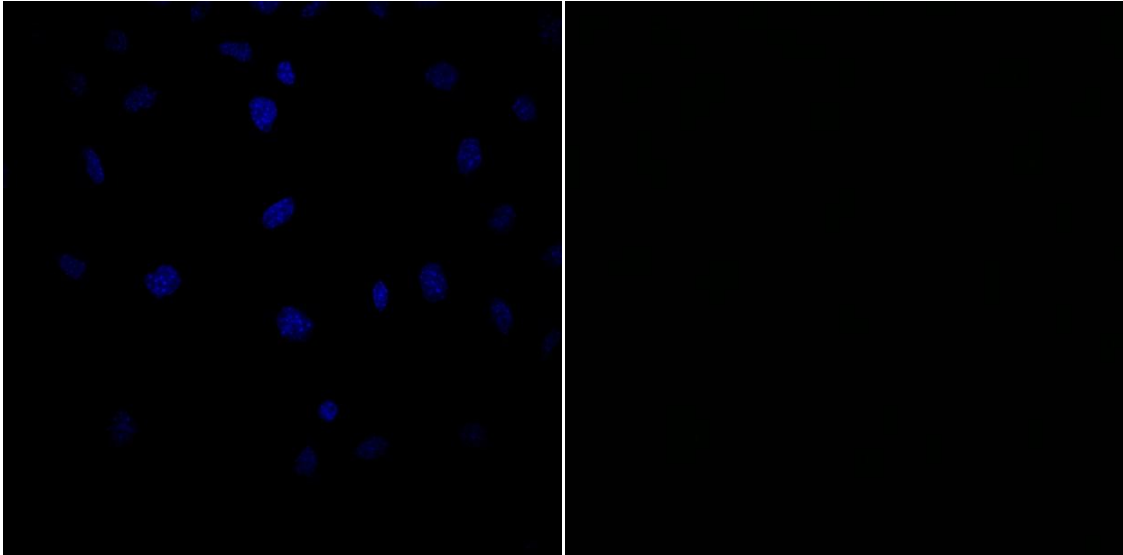
KUVIO 31. MK4-solut, joiden E-kadheriinin reporterissa oli pitkä promoottori (MK4EcadL)



KUVIO 32. MK4-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli pitkä promoottori sekä tehostajajakso (MK4EcadLen)

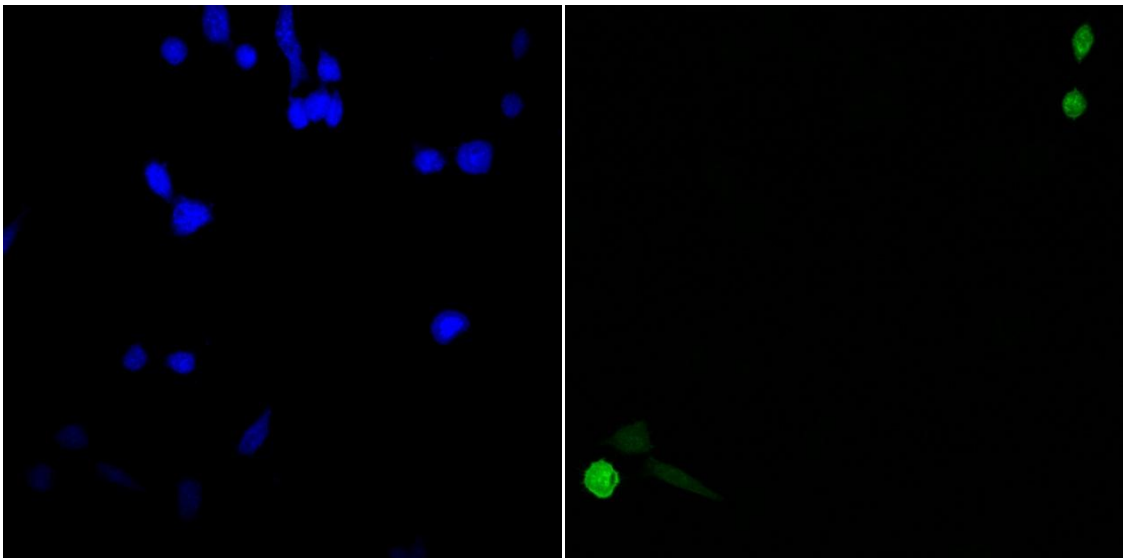


KUVIO 33. MK4-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli lyhyt promoottori (MK4EcadS)

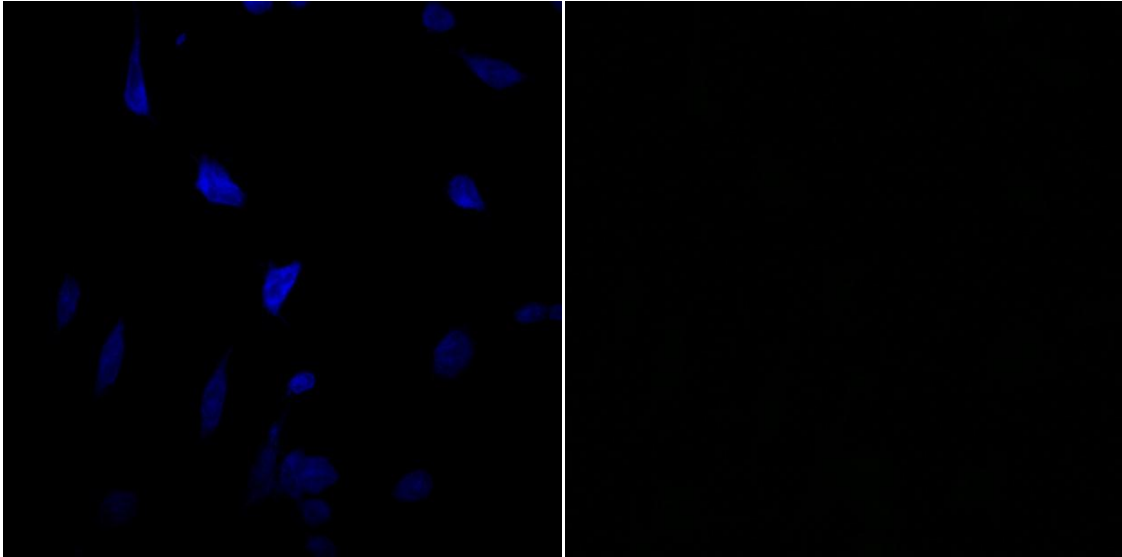


KUVIO 34. MK4-solut, joiden E-kadheriinin reporterissa oli lyhyt promoottori ja tehostajajakso (MK4EcadSen)

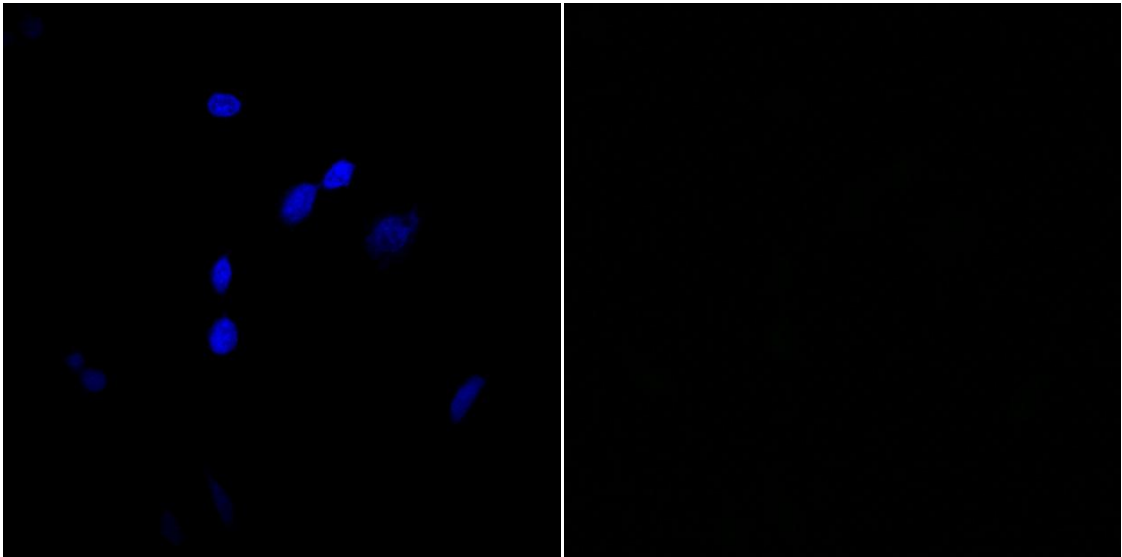
W4MC-solut



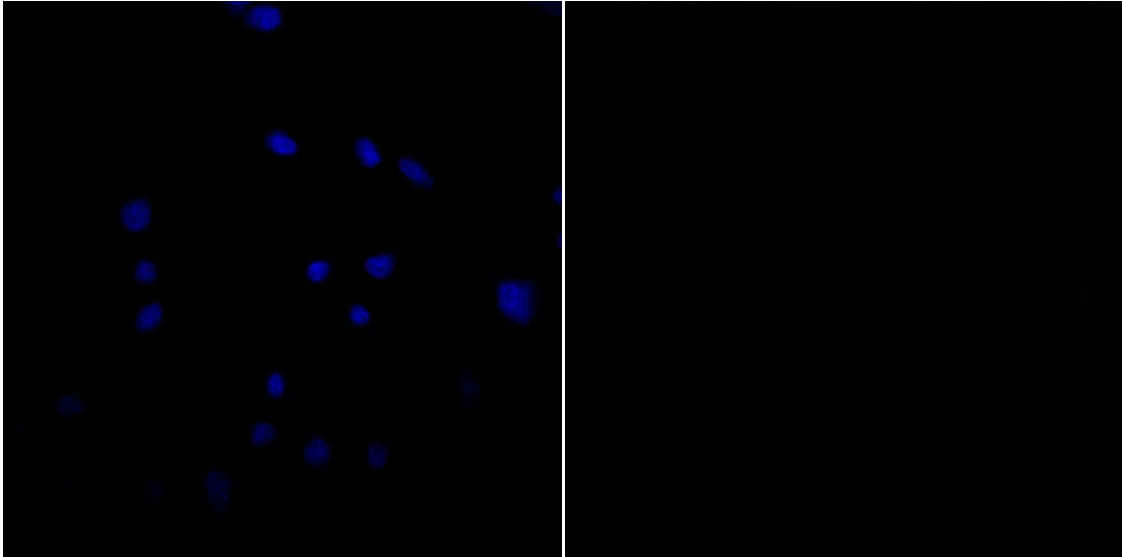
KUVIO 35. W4MC-solujen kontrollit. Oikealla vihreänä fluoresoiviin soluihin on transfektoitu syto-megaloviruksen promoottorilla varustettu YFP. Tällä voitiin tarkkailla transfektion onnistumista.



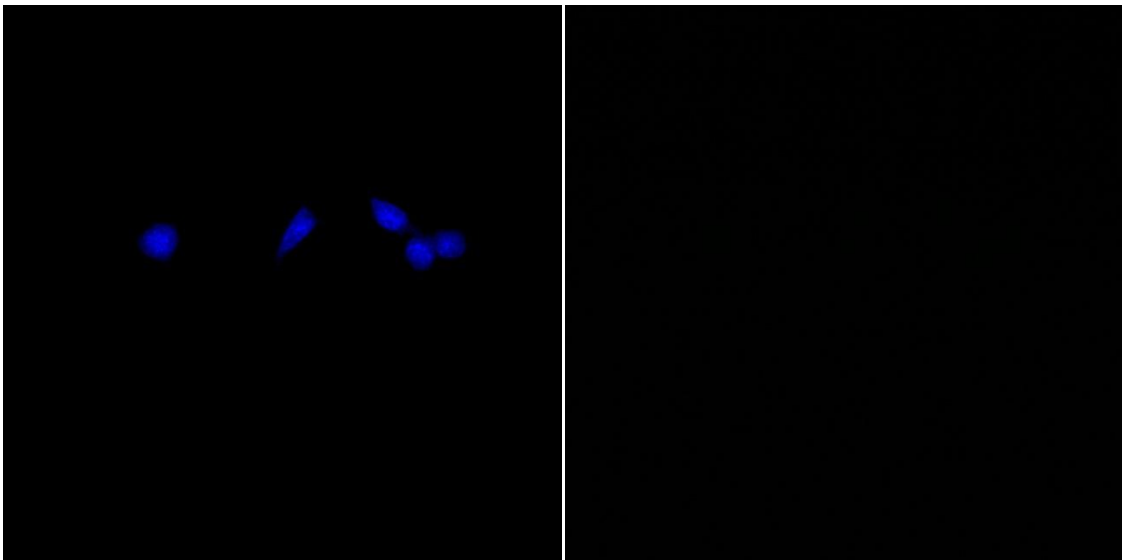
KUVIO 36. W4MC-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli pitkä promoottori (W4MCEcadL)



KUVIO 37. W4MC-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli pitkä promoottori sekä tehostaja-jakso (W4MCEcadLen)

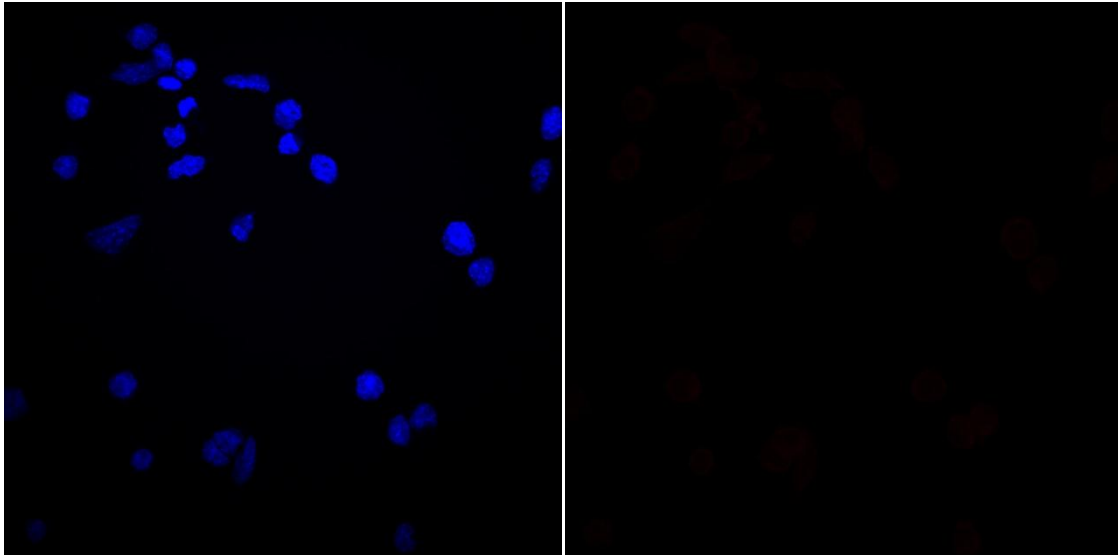


KUVIO 38. W4MC-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli lyhyt promoottori (W4MCEcadS)

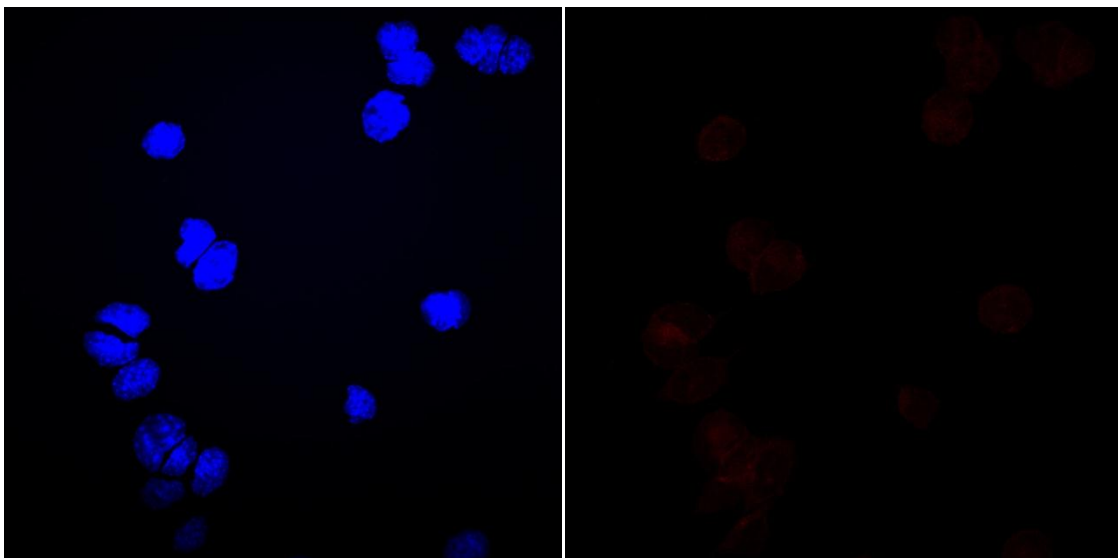


KUVIO 39. W4MC-solut, joiden E-kadheriinin reportterissa oli lyhyt promoottori sekä tehostaja-jakso (W4MCEcadSen)

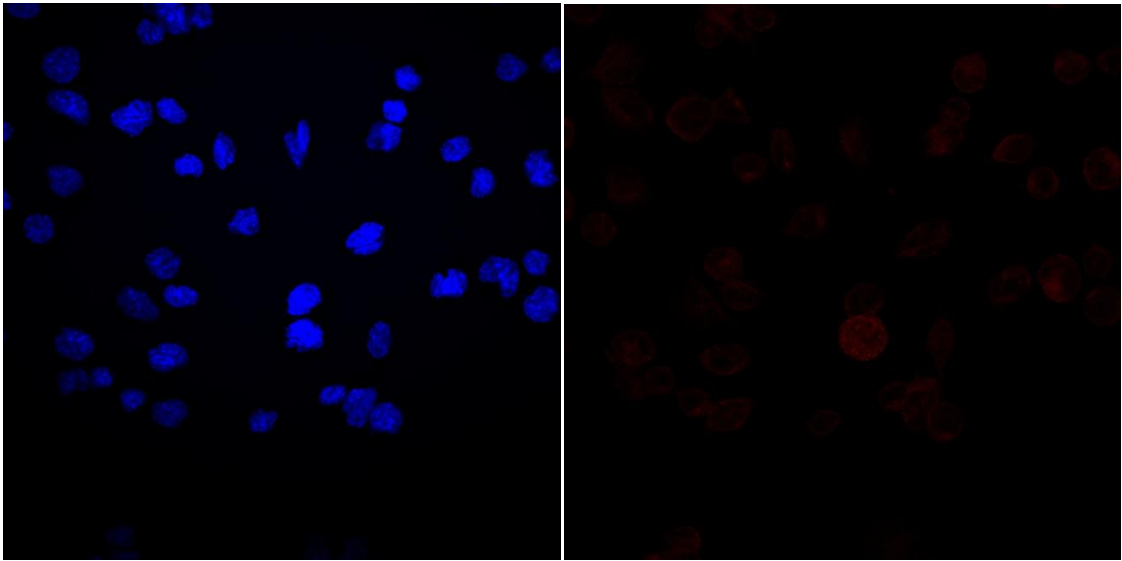
Litiumkloridi



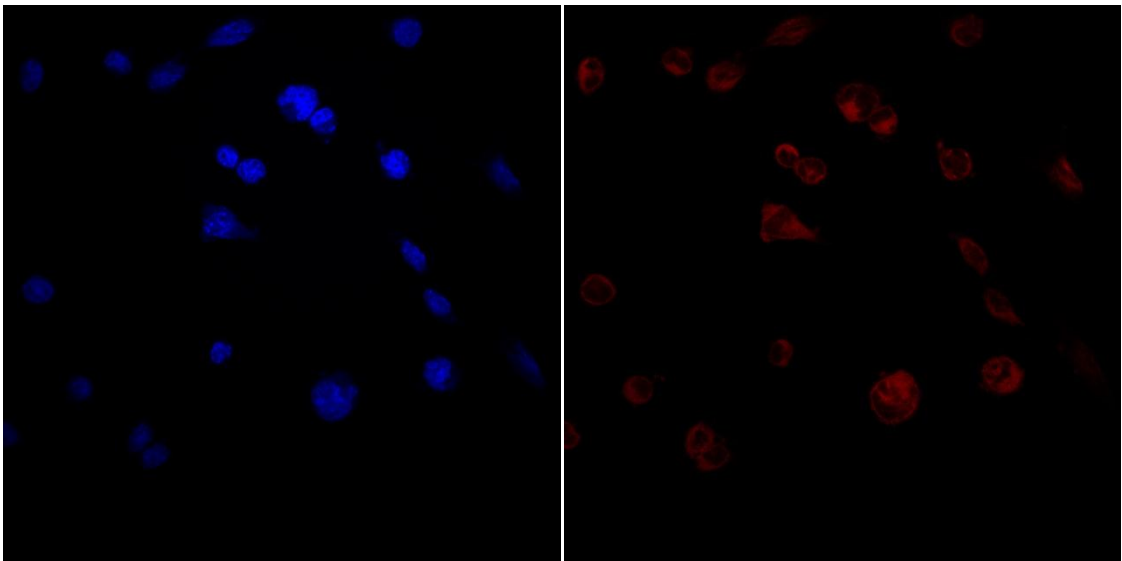
KUVIO 40. Vasta-ainevärijäyksen kontrolli. Mukautetulla solumediumilla indusoitujen MK3-solujen vasta-ainevärijäys on tehty ilman primaaria vasta-ainetta sekundaarisen vasta-aineen epäspesifin sitoutumisen havainnollistamiseksi. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä, ja mahdollinen epäspesifinen värjäytyminen näkyisi oikeassa ruudussa punaisena. Samaa kontrollia käytettiin jokaiselle eri induktorille.



KUVIO 41. E-kadheriinin vasta-ainevärijäys indusoimattomille MK3-soluille. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä ja vasta-ainevärijäyksen signaali oikeassa ruudussa punaisella.

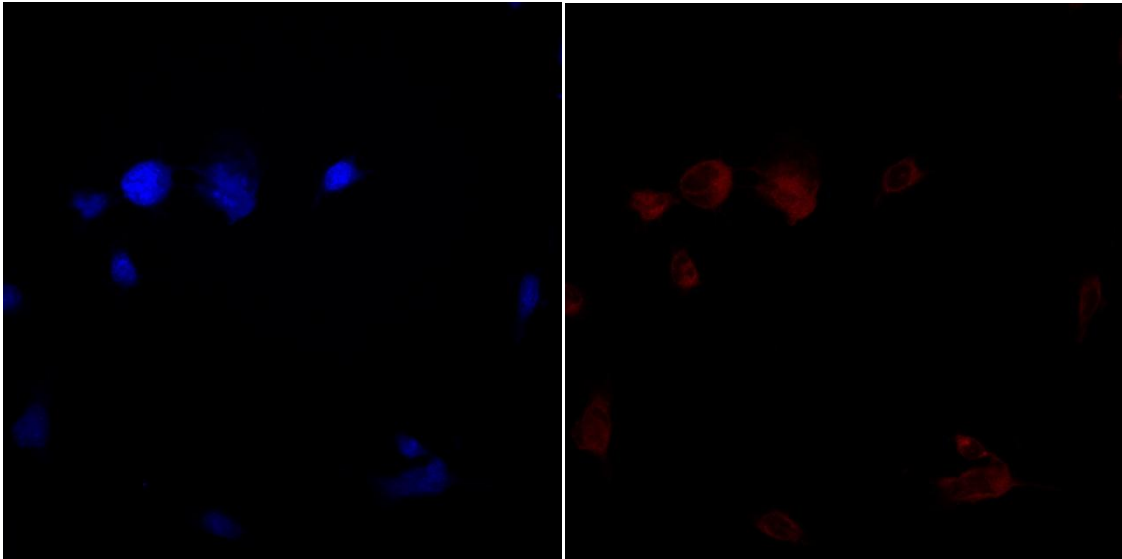


KUVIO 42. E-kadheriinin vasta-ainevärijäys 5 M-litiumkloridilla (LiCl) indusoiduille MK3-soluille (matala LiCl-konsentraatio). Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä ja vasta-ainevärijäyksen signaali oikeassa ruudussa punaisella.

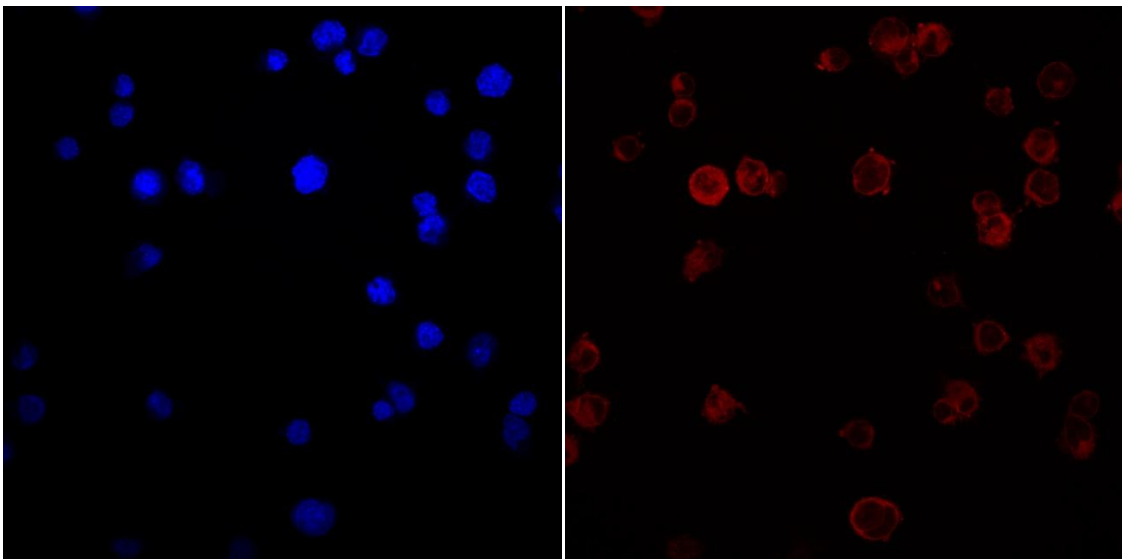


KUVIO 43. E-kadheriinin vasta-ainevärijäys 15 M-litiumkloridilla (LiCl) indusoiduille MK3-soluille (korkea LiCl -konsentraatio).

Mukautettu solumedium ja BIO



KUVIO 44. E-kadheriinin vasta-ainevärjäys mukautetulla solumediumilla indusoiduille MK3-soluille. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä ja vasta-ainevärjäyksen signaali oikeassa ruudussa punaisella.



KUVIO 45. E-kadheriinin vasta-ainevärjäys BIO:lla indusoiduille MK3-soluille. Vasemmassa ruudussa näkyvät solujen tumat sinisenä ja vasta-ainevärjäyksen signaali oikeassa ruudussa punaisella.